DNA-KERNMATRIX-BEZIEHUNGEN IN RASCH PROLIFERIERENDEN TIERISCHEN ZELLEN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
RICHARD HERZOG
aus Madrid

1984

UNIV.
LEIDEN
KGL.

DNA-KERNMATRIX-BEZIEHUNGEN IN RASCH PROLIFERIERENDEN TIERISCHEN ZELLEN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
RICHARD HERZOG
aus Madrid

1984

Tag der mündlichen Prüfung:	30. Mai 1984
Dekan:	Prof. Dr. J. Strähle
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Probst
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Voelter

für meine Mutter

Diese Arbeit wurde auf Anregung und unter der Leitung von
Herrn Prof. Dr. H. Probst
am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen
durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Probst für die Überlassung von Thema und Arbeitsplatz, für seine wertvolle Hilfe bei organisatorischen und technischen Problemen sowie für seine ständige Diskussionsbereitschaft und seine nützlichen Ratschläge.

Sehr dankbar bin ich ferner Dr. Antal Kiss (Szeged, Ungarn) für die Übersendung von Bacillus sphaericus R, sowie Dr. Manfred Steinemann (Max-Planck-Institut für Biologie, Tübingen), Dr. Ulrich Plagens (Max-Planck-Institut für Zellbiologie, Ladenburg) und Dr. Jaap Waterborg (University of California, Davis) für äußerst hilfreiche Ratschläge.

Frau Ilse Kropf nahm stets großes Interesse am Fortschritt dieser Arbeit und zeigte ein freundliches Entgegenkommen.

Dem Fonds der Chemischen Industrie danke ich für ein großzügiges Doktorandenstipendium. Ohne die Unterstützung des Fonds wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen, so daß ich für die gewährte Hilfe zu tiefstem Dank verpflichtet bin.

Teile dieser Arbeit wurden anläßlich des Erwin-Riesch-Symposions in Tübingen (20.-22.4.1983) und des NATO-Kurses „Structure and Function of the Genetic Apparatus" in Erice/Italien (18.-30.9.1983) vorgestellt.

Abstract

Herzog, Richard

DNA-Kernmatrix-Beziehungen in rasch proliferierenden tierischen Zellen

Besonderheiten der DNA an den Kernmatrix-Verankerungsstellen wurden untersucht. Dazu wurden Ehrlich-Ascites-Tumorzellen mit der Restriktionsendonuclease Bsp RI verdaut, die Matrix isoliert und die an sie gebundenen DNA-Fragmente gereinigt und näher charakterisiert.

Die matrixassoziierte DNA wurde auf Einzelstrangbereiche mittels isopyknischer Zentrifugation, Hydroxyapatit-Chromatographie und Nitrocellulose-Chromatographie untersucht. Während die ersten beiden Methoden keinen Hinweis auf Einzelstrangbereiche geben, findet man mit der dritten Methode eine 19fach höhere Bindung langzeitmarkierter DNA (14fach bei pulsmarkierter DNA) an Nitrocellulose bei Fragmenten, die matrixassoziiert sind. Nach stochastischer Fragmentierung der Matrix-DNA-Fragmente mittels Kryolyse ist ihre Nitrocellulosebindung 7mal so hoch wie diejenige von Nichtmatrix-DNA-Fragmenten. Diese Bindung verschwindet nach Verdau mit einzelstrangspezifischer Nuclease zum größten Teil.

Kurze einzelsträngige, aus helikaler DNA herausschmelzbare Stücke („nonnascent pieces") sind in der Matrix-DNA-Fraktion 10-20mal angereichert. Sie sind ca. 50 Nucleotide bei Matrix-DNA und ca. 300 Nucleotide bei Nichtmatrix-DNA lang. Diejenigen aus Matrix-DNA sind sehr schnell reassoziierend (ca. 50% Reassoziation bei c_0t-Wert von 10^{-3}), die aus Nichtmatrix-DNA langsam reassoziierend (ca. 5% Reassoziation bei c_0t-Wert von 10^2). Im isopyknischen Cs_2SO_4-Gradienten, der Ag^+-Ionen zur Erhöhung der Dichteunterschiede enthält, erscheinen die nonnascent pieces von Nichtmatrix-DNA im Einzelstrangbereich, diejenigen aus Matrix-DNA zwischen Einzel- und Doppelstrangbereich. Durch vorhergehenden Verdau mit Proteinase K oder S1-Nuclease wird bei diesen die Position im Gradienten nicht verändert, nach Alkalibehandlung tritt ein Gipfel im Einzelstrangbereich auf. Im isopyknischen alkalischen CsCl-Gradienten sind zwei Gipfel vorhanden, wobei an dem leichteren die Hauptmenge an Jodmarkierung auftritt, wenn eine Jodierung der Stücke unter proteinspezifischen Bedingungen durchgeführt worden war.

Matrixassoziierte DNA-Fragmente sind an replikativen Strukturen („Okazaki-Stücken") angereichert. Der Anteil der Markierung replizierender DNA (22% bei 4 min-Puls) an der Kernmatrix ist größer als derjenige langzeitmarkierter DNA (2,6% bei 20 Std.-Markierung).

Die erhaltenen Ergebnisse stehen in Einklang mit einem Modell, in dem „displacement loop"-ähnliche Strukturen, die Einzelstrangbereiche und nonnascent pieces enthalten, an der Verankerung der DNA an die Matrix beteiligt sind.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536512_0017

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1	EINLEITUNG	1
2	MATERIAL UND METHODEN	6
2.1	Material	6
2.1.1	Zellmaterial	6
2.1.2	Referenz-DNA	6
2.1.3	Bacillus sphaericus R	6
2.1.4	Kulturflaschen	6
2.1.5	Kulturmedium für Ehrlich-Ascites-Tumorzellen	7
2.1.6	Medium für die Anzucht von Bacillus sphaericus R	7
2.1.7	Agar	8
2.1.8	Puffer und sonstige Lösungen	8
2.1.9	Radiochemikalien	10
2.1.10	Sonstige Chemikalien	11
2.1.11	Nitrocellulose	11
2.1.12	Hydroxyapatit	11
2.1.13	Enzyme	11
2.1.14	Szintillatoren, Lösungsvermittler, Filter	12
2.2	Methoden	12
2.2.1	Zellentnahme	12
2.2.2	Bestimmung der Zelldichte	12
2.2.3	Pulsmarkierung mit ^{3}H-Thymidin	12
2.2.4	Langzeitmarkierung mit ^{14}C-Thymidin	13
2.2.5	Markierung mit ^{32}P-Orthophosphat	13
2.2.6	Proteinmarkierung mit Na^{125}J	13
2.2.7	Zellkernisolierung	14
2.2.8	Verdau mit der Restriktionsendonuclease Bsp RI	14
2.2.9	Isolierung der Kernmatrix	15
2.2.10	DNA-Isolierungsmethode A	15
2.2.11	DNA-Isolierungsmethode B	17
2.2.12	DNA-Isolierungsmethode C	17
2.2.13	DNA-Äthanolfällung	18
2.2.14	DNA-Fragmentierung mittels Ultraschall	18

Seite

2.2.15 DNA-Fragmentierung mittels Kryolyse 18
2.2.16 Verdau von Einzelstrang-DNA mit der Nuclease S1 19
2.2.17 Nitrocellulose-Chromatographie an Säulen 19
2.2.18 Nitrocellulose-Chromatographie an Filtern 19
2.2.19 Hydroxyapatit-Chromatographie 20
2.2.20 Thermische Hydroxyapatit-Chromatographie 20
2.2.21 Aufnahme einer c_0t-Kurve 21
2.2.22 Filterhybridisierung 22
2.2.23 Sucrosegradienten-Zonensedimentation 23
2.2.24 Alkalische CsCl-Gleichgewichtsdichtezentrifugation 23
2.2.25 Ag^+/Cs_2SO_4-Gleichgewichtsdichtezentrifugation 24
2.2.26 DNA-Elektrophorese in einem nicht denaturierenden 5%igen Polyacrylamidgel 25
2.2.27 DNA-Elektrophorese in einem denaturierenden 5%igen Formamid-Polyacrylamidgel 25
2.2.28 Allgemeines zur Messung der Radioaktivität 26
2.2.29 Radioaktivität des säurefällbaren Materials von ganzen Zellen 26
2.2.30 Radioaktivität des säurelöslichen Materials von ganzen Zellen 27
2.2.31 Radioaktivität von säurefällbarem Material in wäßrigen DNA-Lösungen 27
2.2.32 Radioaktivitätsbestimmung nach der Tüpfelmethode 27
2.2.33 Radioaktivität von ^{32}P-markierten Proben 27
2.2.34 Radioaktivität von ^{125}J-markierten Proben 28
2.2.35 Radioaktivität von Polyacrylamidgelen 28
2.2.36 Bestimmung der Nitrocellulose-bindenden Radioaktivität im Filterbindungstest 28
2.2.37 Bestimmung der Radioaktivität von nichteluierbarer DNA auf Nitrocellulose-Säulen 28
2.2.38 Bestimmung der Radioaktivität von nichteluierbarer DNA auf Hydroxyapatit-Säulen 29
2.2.39 Isolierung der Restriktionsendonuclease Bsp RI 29

		Seite
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	30
3.1	Darstellung matrixassoziierter DNA-Fragmente	30
3.1.1	Einkreisung der DNA-Anheftungsstelle an der Kernmatrix	30
3.1.2	Bevorzugte Anheftung replizierender DNA an die Kernmatrix	33
3.1.3	DNA-Fragmentgrößenverteilung nach Bsp RI-Verdau ganzer Kerne	35
3.1.4	Anreicherung des Satelliten in der matrixgebundenen DNA	36
3.1.5	Einfluß unvollständiger Matrix-Auflösung auf die Sedimentationsprofile der matrixassoziierten Fragmente	41
3.1.6	DNA-Freisetzung während der Matrixisolierung	45
3.2	Untersuchung der matrixgebundenen DNA auf Einzelstrangbereiche	47
3.2.1	Allgemeines	47
3.2.2	Untersuchung auf Einzelstrangbereiche mittels isopyknischer Zentrifugation	48
3.2.3	Untersuchung auf Einzelstrangbereiche mittels Hydroxyapatit-Chromatohraphie	50
3.2.4	Untersuchung auf Einzelstrangbereiche mittels Nitrocellulosebindung	55
3.3	Untersuchung der matrixgebundenen DNA auf „nonnascent pieces"	70
3.3.1	Allgemeines	70
3.3.2	Isolierung der nonnascent pieces	70
3.3.3	Überprüfung der 55°C-Fraktion auf Artefakte	74
3.3.4	Untersuchung der nonnascent pieces auf Reassoziationseigenschaften	76
3.3.5	Hydroxyapatit-Chromatographie von nonnascent pieces	79
3.3.6	Größenbestimmung der nonnascent pieces	80

		Seite
3.3.7	Untersuchung der nonnascent pieces im isopyknischen Gradienten	88
3.3.8	Untersuchung der nonnascent pieces auf fest gebundene Proteine	95
3.3.9	Filterhybridisierung der nonnascent pieces mit Matrix-DNA	99
3.4	Abschließende Diskussion	101
4	ZUSAMMENFASSUNG	112
5	LITERATUR	114

Abkürzungen

Folgende Abkürzungen werden in dieser Arbeit benutzt:

Bis	N,N'-Methylen-bis-acrylamid
cpm	Impulse pro Minute
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dpm	Zerfälle pro Minute
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EGTA	Äthylenglykol-bis-(2-aminoäthyläther)-N,N'-tetraessigsäure
$\overline{M}_{cpm}$	mittleres Molekulargewicht relativ zur radioaktiven Markierung
min	Minute(n)
MSH	Mercaptoäthanol
NaTT	Natriumtetrathionat
OD_{260}	optische Dichte bei 260 nm
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POPOP	2,2'-p-Phenylen-bis-(5-phenyloxazol)
PPO	2,5-Diphenyloxazol
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute
S	Sedimentationskoeffizient $S_{20,w}$
Sarcosyl	N-Lauroylsarcosin-Natriumsalz
SDS	Natriumdodecylsulfat
Std.	Stunde(n)
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
Thd	Thymidin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Vol.	Volumen, Volumina

1 EINLEITUNG

In jedem Säugetierzellkern liegt DNA beträchtlicher Länge vor. Beispielsweise enthält ein menschlicher Zellkern (mit diploidem Chromosomensatz), der einen durchschnittlichen Radius von 2,6µm und ein Volumen von 75 μm^3 hat, ca. $5{,}5 \cdot 10^9$ Basenpaare DNA. In nichtkondensierter Form würde die Länge der DNA 1,7 Meter betragen, was dem 650 000fachen des Kernradius entspricht (1). Die Replikation der DNA muß räumlich geordnet stattfinden, damit sich die entstehenden Tochterchromosomen nicht verwirren und während der Mitose segregiert werden können. Hinzu kommt, daß die Replikation eukaryontischer DNA zeitlich geordnet verläuft. Unterschiedliche Genomabschnitte replizieren zu bestimmten Zeiten der S-Phase nach einem Schema, das für alle folgenden Zyklen der Zellteilung gleich ist (2, 3). All dieses impliziert erhebliche topologische Probleme und war Anlaß, die Existenz eines ordnenden Prinzips zu postulieren (4). Vieles spricht dafür, daß in eukaryontischen Zellen eine als „Kernmatrix" bezeichnete Struktur unter anderem derartige ordnende Funktionen wahrnimmt.

Die Kernmatrix im Sinne der vorliegenden Arbeit wurde erstmals durch Berezney und Coffey (5) erhalten. Sie ist eine verbleibende Skelettstruktur des Zellkernes, wenn dieser mit Hilfe nichtionischer Detergentien, Puffer sehr geringen und sehr hohen Salzgehaltes, DNase und RNase extrahiert wurde (6-8). Die Kernmatrix besteht morphologisch aus drei Komponenten: peripherer Lamina-Kernporen-Komplex, residualer Nucleolus sowie fibrilläres und granuläres Interchromatin-Netzwerk (5). Kernmatrices aus einer Vielzahl eukaryontischer Zellen wurden bisher isoliert und näher charakterisiert, unter anderem auch aus Ascites-Tumorzellen wie in dieser Arbeit (9, 10).

Seit der ersten Beschreibung der Kernmatrix vor 10 Jahren haben sich sehr viele Ergebnisse angehäuft, nach denen es

sich bei dieser nicht einfach um eine statische Struktur handelt, sondern um ein eminent wichtiges ordnendes System, an dem sich viele grundlegende molekularbiologische Vorgänge abspielen:

Neu replizierte DNA ist mit der Kernmatrix assoziiert (11 - 20); replizierende DNA-Strukturen sind an ganz bestimmten Stellen mit der Kernmatrix verbunden (16-19); DNA-Polymerase α ist fest mit der Kernmatrix aktiv replizierender Leber, aber nicht mit der einer normalen Leber verbunden (21). Ribosomale RNA-Gene sind in der Matrix-gebundenen Rest-DNA sechsfach angereichert (16); SV 40-Sequenzen sind in Matrix-gebundener DNA von SV 40-transformierten 3T3-Zellen vier- bis siebenfach angereichert (22); das transkriptionell aktive Ovalbumingen ist mit der Kernmatrix der Henneneileiter bevorzugt verbunden, während das inaktive ß-Globingen in der Eileiter-Kernmatrix nicht angereichert ist (23). RNP-Partikeln sind Bestandteil des internen Netzwerkes der Kernmatrix (5, 7, 12, 24-28); nahezu die gesamte hnRNA und snRNA sind mit der Kernmatrix verbunden (26, 29-34); Globin-RNA, die Introns enthält, ist fest mit der Kernmatrix von Hühnererythroblasten assoziiert (35); Precursor-mRNAs für Ovomucoid und Ovalbumin befinden sich an der Kernmatrix der Henneneileiter (36). HnRNA ist an die Kernmatrix mittels zwei der wichtigsten hnRNP-Proteine gebunden (32); RNA wird an festen Transkriptionskomplexen an der Kernmatrix synthetisiert (33); nascierende RNA ist am 5' cap an die Kernmatrix gebunden (33); das Processing von hnRNA zu mRNA findet an der Kernmatrix statt (34).

Bestimmte SV 40-spezifische Proteine sind ausschließlich mit der Kernmatrix infizierter HeLa-Zellen assoziiert (37). Signifikante Anteile des Polyoma T-Antigens und intakte virale Genome sind mit der Kernmatrix lytisch infizierter 3T6-Zellen verbunden; die Kernmatrix ist ein Ort der viralen DNA-Replikation (38). Die Kernmatrix aus den Makronuclei von Tetrahymena kontrahiert sich reversibel bei einer

Verminderung der Ca^{2+}- und Mg^{2+}-Konzentration auf 5 mM bzw. Erhöhung auf 125 mM (39); die Lipid-Fluidität der Kernmembran wird durch innere Komponenten der Kernmatrix moduliert (40, 41).

Spezifische hochaffine gewebs- und steroidspezifische Androgen- und Östrogenrezeptoren sind mit der Kernmatrix von Zielorganen verbunden (42-46); Lectinbindungsorte befinden sich bei Seegurkenembryonen an der Kernmatrix (47); Bindungsorte für EGF (epidermaler Wachstumsfaktor) wurden in chromatinlosen Kernen gefunden (48).

Von der Vielzahl der Prozesse, die sich an der Kernmatrix abspielen, ist die DNA-Replikation am ausführlichsten untersucht worden. Über den molekularen Mechanismus der DNA-Anheftung an die Matrix ist jedoch wenig bekannt. Man weiß, daß sowohl im Interphasekern als auch im Metaphasechromosom die DNA in Schleifen („loops") organisiert ist, die auch Domänen genannt werden (49-56). Dingman postulierte 1974, daß Chromosomen mit bidirektionaler Replikation über ihre Replikationsgabeln an eine Membran gebunden sind, so daß die Replikation topologisch festgelegt ist (4). Durch die Anheftung an einen Kernbestandteil kommt Ordnung in den Ablauf dieses biologischen Prozesses (vgl. Abb. 1).

Später konnte gezeigt werden, daß der bevorzugte Ort der DNA-Anheftung während der Replikation nicht die Kernmembran, sondern die Kernmatrix ist (57). Somit wird heutzutage das Dingmann'sche Modell bei Eukaryonten auf die Kernmatrix übertragen (Abb. 2).

Wie die Anheftung der DNA an die Matrix erfolgt, ist nicht geklärt. Es wurde untersucht, ob die DNA Hybride mit der RNA bildet, die in der Kernskelett-Struktur vorhanden ist; eine Anheftung über derartige Hybride konnte jedoch ausgeschlossen werden (49). Ferner wurde untersucht, ob bestimmte DNA-

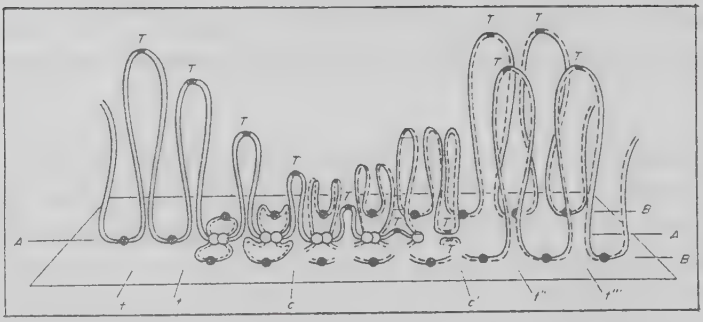

Abb. 1: Schema eines eukaryontischen Chromatids während der Replikation. Weiße Kreise: bidirektionale Replikationskomplexe (ein Paar Replikationsgabeln); schwarze Kreise: Origins oder Initiationsstellen; T: Terminationsstelle. Ein komplettes elterliches Replikon befindet sich zwischen t und t', und zwei replizierte Tochter-Replikons an einem anderen Chromosomenabschnitt sind zwischen t'' und t'''. A-A stellt die Achse dar, an der die Chromatidtrennung nach vollständig abgeschlossener Replikation erfolgt. Aus (4).

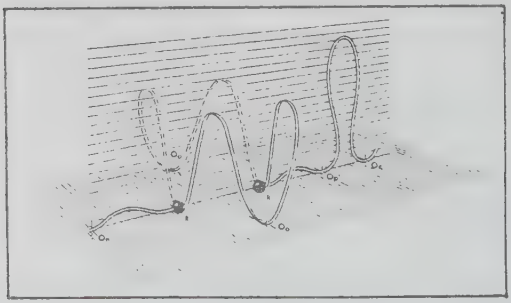

Abb. 2: Räumliche DNA-Anordnung an der Kernmatrix. Die Anheftung erfolgt über die Replikationsorigins O_n, O_o, O_p und O_q und die mit einer schwarzen Kugel dargestellten Replikationsgabeln. Aus (14).

Sequenzen an der Kernmatrix-Verankerungsstelle vorhanden sind. Hier konnten aber keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden: Während einige Autoren unique-Sequenzen an der Verankerungsstelle fanden (13), konnten andere mittelrepetitive (58, 59) oder hochrepetitive (60) Sequenzen feststellen. Basler et al. zeigten, daß die Sequenzen an den Anheftungsstellen keinen Unterschied zu denen der Gesamt-DNA aufweisen (61).

Festgestellt wurde, daß die DNA mit sehr fest gebundenen Proteinen der Kernmatrix verbunden ist (62, 63). Ob eine bestimmte Struktur bei der nichtreplizierenden DNA an der Bindung der Matrix-Proteine beteiligt ist oder ob keinerlei strukturellen Unterschiede im Vergleich zur Rest-DNA bestehen, wurde bisher nicht überprüft. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob an den Kernmatrix-Anheftungsstellen der DNA von Ehrlich-Asciteszellen besondere DNA-Strukturen feststellbar sind. Aufgrund früherer Ergebnisse des hiesigen Labors (64) galt dabei Strukturen, die Einzelstrangbereiche (65) exponieren und kurze nichtreplikative DNA-Ketten („nonnascent pieces", (66)) enthalten, besonderes Interesse.

Es konnte gezeigt werden, daß die DNA im Bereich der Matrix-Anheftungsstellen vermehrt einzelsträngige Anteile exponiert und „nonnascent pieces" enthält. Darüber hinaus wurden Indizien für eine sehr feste Bindung eines Teils der „nonnascent pieces" an Proteine erhalten, was mit neueren Befunden über die Bedeutung fest gebundener Proteine für die Verankerung der DNA in der Matrix (62, 63) in Einklang steht.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Zellmaterial

Die hier verwendeten Ehrlich-Ascites-Tumorzellen sind ein sowohl in vivo als auch permanent in vitro züchtbarer Stamm (67, 68). Sie können ohne Schwierigkeiten von der Maus in die Kultur und umgekehrt überimpft werden. Die biologischen Eigenschaften dieser Zellen sind in (69) beschrieben. Ihre Haltung als Ascitestumor erfolgt auf weiblichen NMRI-HAN-Mäusen (Gewicht: 20 - 25 g; Züchtung: Zentralinstitut für Versuchstiere, Hannover). Zur Inokulation wurden 0,2 ml (ca. $25 \cdot 10^6$ Zellen) eines 7 Tage alten Ascites in die Bauchhöhle gesunder Mäuse überimpft. Für die Experimente wurde durchweg Zellmaterial verwendet, das 4 Tage nach der Inokulation entnommen wurde (der Tag des Überimpfens zählt als nullter Tag). Zum Zeitpunkt der Entnahme befinden sich die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase (69).

2.1.2 Referenz-DNA

Als Referenz-DNA wird eine Mischung aus beschallter denaturierter und nativer DNA aus Ehrlich-Ascites-Tumorzellen bezeichnet, die ein mittleres Molekulargewicht von ca. 110 000 D hat.

2.1.3 Bacillus sphaericus R

Zur Isolierung der Restriktionsendonuclease Bsp RI wurde der Organismus Bacillus sphaericus, Serotyp R verwendet. Er wurde freundlicherweise von Pal Venetianer und Antal Kiss (Szeged, Ungarn) überlassen.

2.1.4 Kulturflaschen

Die zur Zellhaltung in vitro verwendeten Glasgefäße wurden zur Entfernung aller organischen Reste mit Nitriersäure (2 Vol. H_2SO_4 konz., > 98%; 1,5 Vol. HNO_3 rauchend, 95-98%; 0,5-1 Vol. Oleum, 65%; alles chemisch rein) über Nacht gereinigt. Im Gegensatz zu Karzel (67) beobachtet man dann keinen Zellwuchs an der Glasoberfläche (Randwuchs).

2.1.5 Kulturmedium für Ehrlich-Ascites-Tumorzellen

Die Haltung der Ascites-Tumorzellen erfolgte in einem Kulturmedium nach Schindler et al. (68) mit folgender Zusammensetzung (alles in aqua bidest.):

15% Pferdeserum (aus frischem Pferdeblut hergestellt und sterilfiltriert, EKS 2-Filter, Seitz)

Salze (in g/l):

NaCl	8,00	$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,20	KH_2PO_4	0,060
KCl	0,40	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	0,05	$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	0,272

Aminosäuren (in mMol/l):

L-Arg·HCl	0,10	L-Ile	0,20	L-Lys	0,02
L-His·HCl	0,05	L-Val	0,20	L-Phe	0,10
L-Cys-Cys	0,05	L-Met	0,05	L-Leu	0,20
L-Glu·NH_2	0,02	L-Thr	0,20	L-Trp	0.02
L-Tyr	0,10				

Vitamine u.a. (in mg/l):

Biotin	0,01	Nicotinamid	0,50
Cholin·HCl	1,50	Riboflavin	0,50
i-Inosit	1,50	Glucose	1000,00
Pyridoxal·HCl	0,50	$NaHCO_3$	1000,00
Ca-Pantothenat	0,50	Penicillin G	30,00
Folsäure	10,00	Streptomycinsulfat	30,00

Die Herstellung des Kulturmediums ist ausführlich in (70) beschrieben. Lösungen werden durch Druckfiltration (EKS-Filter, Seitz) entkeimt. Das Medium ist unter Lichtschutz bei 4°C etwa 14 Tage haltbar.

Bei Experimenten mit Markierungen mit ^{32}P-Orthophosphat wurde phosphatfreies Medium angesetzt.

2.1.6 Medium für die Anzucht von Bacillus sphaericus R

10 g Bacto-Trypton (Difco), 5 g Bacto-Hefe-Extrakt (Difco), 5 g NaCl und 5 g Glucose werden ad 1 l destilliertes Wasser gelöst und 20 min bei 1 atü autoklaviert (71).

2.1.7 Agar

Das Medium für die Anzucht von Bacillus sphaericus R wird zusätzlich mit 10 g Agar/l (Difco) versetzt. Nach dem Autoklavieren wird gut umgeschüttelt und die noch heiße Lösung in Petrischalen abgefüllt, die dann im Kühlschrank unter Lichtschutz aufbewahrt werden.

2.1.8 Puffer und sonstige Lösungen

Hanks-Lösung (in g/l):

NaCl	8,00	KH_2PO_4	0,06
KCl	0,40	Glucose·H_2O	1,00
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,10	$NaHCO_3$	0,30
$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$	0,10	$CaCL_2 \cdot 2\ H_2O$	0,185
$Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$	0,06		

Calciumchlorid wird in gelöster Form als letzte Substanz zugegeben.

Verdaupuffer:

Tris/HCl pH 8,0	15 mM	Spermin	0,15 mM
NaCl	65 mM	Spermidin	0,5 mM
KCl	60 mM	2-Mercaptoäthanol	5 mM
$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$	20 mM	Triton X-100	0,02%
EDTA	0,2 mM		
EGTA	0,2 mM		

Der Puffer wird mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

Stoppuffer:

Zum Verdaupuffer kommen zusätzlich

EDTA	5 mM
EGTA	0,5 mM

Step 1-Puffer (in mMol/l):

Tris/HCl pH 7,4	10,0
$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$	0,2
PMSF	1,0
NaTT	0,1

Step 2-Puffer (in mMol/l):

Tris/HCl pH 7,4	10,0
$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$	0,2
NaCl	2000,0
PMSF	1,0
NaTT	0,1

Kern-Puffer (in mMol/l):

Tris/HCl pH 7,4	10,0
$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$	5,0
Sucrose	240,0

Brij-Puffer:
wie Kern-Puffer; zusätzlich 0,5% Brij-58

Lysepuffer:

Tris/HCl pH 7,9	0,05 Mol/l
NaCl	0,10 Mol/l
EDTA	0,10 Mol/l
Sarcosyl	1%

RNase-Puffer (in mMol/l):

Tris/HCl pH 8,0	50,0
NaCl	10,0
EDTA	5,0

0,4 IEBS-Puffer (in mMol/l):

Tris/HCl pH 6,75	50,0
NaCl	400,0
EDTA	1,0

0,1 IEBS-Puffer (in mMol/l):

Tris/HCl pH 6,75	50,0
NaCl	100,0
EDTA	1,0

1·SSC-Puffer (in mMol/l):

NaCl	0,14
$Na_3Citrat \cdot 2\ H_2O$	0,05

50·Denhardt-Lösung (in g/l):

Ficoll (Pharmacia)	10,0
Polyvinylpyrrolidon	10,0
Rinderserumalbumin (Fluka)	10,0

20·SSPE-Puffer (in mMol/l):

$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ pH 7,4	200,0
NaCl	3600,0
EDTA	20,0

Vorhybridisierungslösung:

Formamid	50%
Denhardt-Lösung	5×
SSPE-Puffer	5×
SDS	0,1%
denaturierte Heringssperma-DNA	100 µg/ml

Die Lösung wird sterilisiert und bei -20°C bis zur Verwendung aufbewahrt.

Boratpuffer:

Borsäure/NaOH pH 9,2 10,0 mM

Der Puffer wird mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

Phenol pH 9:

Frisch unter Stickstoff destilliertes Phenol wird mit 1 mM EDTA im Verhältnis 9 : 1 gemischt, mit 12 N KOH auf pH 9 eingestellt und bei -20°C in Portionen gelagert.

2.1.9 Radiochemikalien

(methyl-^{3}H)-Thymidin, 70-90 Ci/mMol

(2-^{14}C)-Thymidin, 50-60 mCi/mMol

(^{32}P)-Orthophosphat, 30-50 mCi/ml, trägerfrei

Na^{125}J, 100 mCi/ml, trägerfrei

(methyl-^{14}C)-Toluol, 10-20 mCi/mMol sowie (4-^{3}H)-Toluol zur internen Standardisierung bei der Flüssigkeitsszintillationszählung

Die Radiochemikalien wurden von Amersham Buchler (Braunschweig) oder NEN Chemicals (Dreieich) bezogen.

2.1.10 Sonstige Chemikalien

CsCl, Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg
Sucrose, Einmachraffinade, Südzucker AG
Ethidiumbromid, reinst, Serva
Bei allen weiteren Chemikalien handelt es sich um Produkte der Firmen E. Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) in p.a.-Qualität, soweit nicht im Text anders vermerkt.

2.1.11 Nitrocellulose

Ca. 15 g Nitrocellulose (Walsroder Collodiumwolle E 1250, Wolff Walsrode AG, Walsrode) wurden in 1 l dest. Wasser 15 min kräftig gerührt, absitzen gelassen und dekantiert. Der Vorgang wurde so lange wiederholt, bis der Überstand klar war. Die Nitrocellulose wurde in destilliertem Wasser unter Zusatz von Chloroform bei +4°C aufbewahrt und vor Verwendung 30 min im Wasserstrahlvakuum entgast.

2.1.12 Hydroxyapatit

Hydroxyapatit wurde nach einer von Bernardi (72) modifizierten Methode, die erstmals von Tiselius et al. (73) angegeben wurde, hergestellt.

2.1.13 Enzyme

Restriktionsendonuclease Bsp RI (EC 3.1.23.-; eigene Präparation nach 2.2.39)
Proteinase K aus Tritirachium album (EC 3.4.21.14; Boehringer Mannheim): Lösung von 1 mg/ml H_2O dest. wurde 1 Std. bei 37°C vorinkubiert
Nuclease S1 aus Aspergillus oryzae (EC 3.1.30.1; Boehringer Mannheim)
Ribonuclease A aus Rinderpankreas (EC 3.1.27.5; Boehringer Mannheim)
Ribonuclease T_1 aus Aspergillus oryzae (EC 3.1.27.3; Boehringer Mannheim)
RNase-Mix: 1 mg Ribonuclease A (entsprechend 50 Kunitz-Einheiten) wird in 1 ml H_2O dest. gelöst, dreimal 10 min auf

80°C erhitzt, zwischendurch auf Trockeneis eingefroren und anschließend mit 10 000 Einheiten Ribonuclease T_1 versetzt.

2.1.14 Szintillatoren, Lösungsvermittler, Filter

Toluol-Szintillator: 5 g PPO und 0,3 g POPOP werden in 1 l getrocknetem, frisch destilliertem Toluol (BASF, Ludwigshafen) gelöst und lichtgeschützt aufbewahrt.
Triton-Szintillator: Triton X-100 wird mit Toluol-Szintillator im Volumenverhältnis 3 : 7 gemischt und lichtgeschützt aufbewahrt.
Ready-Solv HP (Beckman, Glenrothes)
Hyamine Hydroxyde (Koch-Light Laboratories, Colnbrook Bucks)
Nitrocellulose Membranfilter, Typ BA 90, Porengröße 0,6 µm (Schleicher & Schüll, Dassel)
Glasfaserfilter GF/C (Whatman, Maidstone)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellentnahme

Zur Entnahme der Zellen wurde die Maus durch Genickbruch getötet und das Fell über dem Bauch aufgerissen. Es wurden 2 ml 37°C warmes Kulturmedium (bei sofort anschließender Weiterinkubation) oder 2 ml Hanks-Lösung, die jeweils 5 USP-Einheiten Heparin/ml (Liquemin, Roche) enthielten, intraperitoneal injiziert. Mittels einer Einmalspritze mit Nr. 1-Kanüle (0,9·40 mm) wurde die Ascitesflüssigkeit abgezogen.

2.2.2 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte wurde durch Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Phasenkontrastmikroskop ermittelt.

2.2.3 Pulsmarkierung mit ^{3}H-Thymidin

Zur Pulsmarkierung der DNA werden einer getöteten Maus 2 ml heparinisiertes, auf 37°C vorgewärmtes Kulturmedium vorgespritzt und ca. 4 ml Ascites abgezogen. Mit Kulturmedium wird sofort auf eine Dichte von $200 \cdot 10^6$ Zellen/10 ml eingestellt und diese 10 ml zu 800 µCi ^{3}H-dThd, die 0,9% NaCl

enthalten, gegeben. Es wird im 37°C-Wasserbad ein 4 min-Puls durchgeführt, wobei der Inkubationsansatz ständig geschüttelt wird. Die Beendigung der Markierung erfolgt durch Zugabe des Inkubationsansatzes zu 20 Vol. eiskalter Hanks-Lösung.

2.2.4 Langzeitmarkierung mit ^{14}C-Thymidin

Zur Gewinnung einer gleichmäßig durchmarkierten DNA werden einer getöteten Maus 2 ml heparinisiertes, auf 37°C vorgewärmtes Kulturmedium vorgespritzt und ca. 4 ml Ascites abgezogen. Es werden dann die Ascites-Zellen in Kulturflaschen mit 37°C warmem Kulturmedium mit einem Titer von 400 000 Zellen/ml eingesät. Die Kultur wird mit 0,05 µCi ^{14}C-dThd/ml versetzt und unter Lichtschutz bei 37°C 18-20 Std. wachsen gelassen. Nach dieser Zeit hatte die Zellzahl um ca. 70-80% zugenommen.
Sollte hieran noch ein Chase angeschlossen werden, so wurde die Kultur bei 37°C abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 200 ml 37°C warmem Kulturmedium, das 10^{-5} Mol/l unmarkiertes Thymidin enthielt, resuspendiert. Betrug die Zelldichte weniger als 4 Millionen Zellen/ml, so erfolgte der Chase 1 Std. lang.
Bei der Langzeitmarkierung erfolgen sämtliche Arbeitsvorgänge unter sterilen Bedingungen.

2.2.5 Markierung mit ^{32}P-Orthophosphat

Es wird analog 2.2.4 verfahren, wobei das Kulturmedium alle Bestandteile mit Ausnahme der Phosphate enthält. Anstatt ^{14}C-dThd werden 0,5 mCi ^{32}P-Orthophosphat/100 ml zugegeben.

2.2.6 Proteinmarkierung mit Na^{125}J

Nach (74) wird der Pellet einer äthanolgefällten DNA-Lösung (2.2.13) in 30 µl einer Lösung aus 3 g Harnstoff, 100 mg SDS, 3,5 ml 0,5 M Tris/HCl pH 7,6 aufgelöst, 3 min bei 80°C erhitzt und dann auf Raumtemperatur gebracht. Es werden 5 µl Na^{125}J (100 mCi/ml) und 5µl Chloramin T (12 mg/ml H_2O) zugegeben und 2 min lang gevortext. Gestoppt wird durch Zugabe

von 10 µl einer 10% (w/v) 2-Mercaptoäthanol-Lösung und anschließendem Vortexen. Es wird zweimal gegen 10 l destilliertes Wasser für jeweils mindestens 4 Std. dialysiert.

2.2.7 Zellkernisolierung

Die Präparation der Zellkerne nach (75) erfolgt bei 0-4°C. Die markierten Zellen werden zweimal mit je 200 ml Hanks-Lösung und einmal mit 200 ml Kern-Puffer gewaschen. Anschließend werden die Zellen in 200 ml Brij-Puffer suspendiert und 10 min im Eisbad schwellen gelassen. Kurz vor Ablauf der 10 min wird das mit einem Kühlmantel versehene Homogenisationsgefäß des Ultra-Turrax T 45 mit Arbeitskopf TP 45 G (Janke & Kunkel, Staufen) vollständig und luftfrei mit der Suspension gefüllt und mit einem Schlifthermometer verschlossen. Sobald die Temperatur durch die -20°C kalte umlaufende Kühlflüssigkeit bis fast 0°C absinkt, wird 3mal auf Stufe 9 des Thyristor-Reglers jeweils 20 Sekunden homogenisiert. Zwischen den einzelnen Homogenisationsschritten wird so lange gewartet, bis die Temperatur im Gefäß annähernd 0°C erreicht. Nach der letzten Homogenisation wird die Kernsuspension in ein auf 0°C gekühltes 250 ml Stock-Zentrifugenglas überführt und sofort bei 4°C in einer Stock-Zentrifuge bei Stufe 2 10 min abzentrifugiert. Die am Boden des Zentrifugenglases befindlichen Kerne werden durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Pipette in Verdaupuffer suspendiert und zweimal gewaschen.

Bei ^{32}P-markierten Zellen erfolgt die Zellkernisolierung nicht in einem Ultra-Turrax, sondern in einem Dounce-Homogenisator mit Glaskugelstempel S. Der Glaskugelstempel wird 10mal auf- und abbewegt. Die Trennung der Zellkerne vom Cytoplasma wird unter dem Phasenkontrastmikroskop verfolgt. Ansonsten sind alle Arbeitsschritte die gleichen wie oben.

2.2.8 Verdau mit der Restriktionsendonuclease Bsp RI

Die Zellkerne aus 2.2.7 werden auf $20 \cdot 10^6$ Kerne/ml Verdaupuffer eingestellt und mit 1 Einheit Bsp RI aus eigener Präparation (2.2.39) pro 1000 Kernen 90 min bei 37°C inku-

biert. Alle 10-15 min werden die Zellkerne resuspendiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird in 20 Vol. eiskalten Stoppuffer überführt, abzentrifugiert und noch 2mal mit Stoppuffer gewaschen.

2.2.9 Isolierung der Kernmatrix

Die Bsp RI-verdauten Zellekrne werden mit Step 1-Puffer versetzt, gut resuspendiert und 10 min im Eisbad inkubiert. Dabei wird auf 1 mg DNA/ml Step 1-Puffer eingestellt (1 Million Kerne enthalten 14 µg DNA). Es wird 10 min in der Stock-Zentrifuge bei Stufe 2 abzentrifugiert, mit Step 1-Puffer auf 2 mg anfängliche DNA/ml eingestellt, gut resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Dieser Schritt wird ein zweites Mal durchgeführt. Dann wird mit Step 2-Puffer auf 2 mg anfängliche DNA/ml eingestellt, gut resuspendiert und 10 min im Eisbad inkubiert. Es wird 30 min in der Stock-Zentrifuge bei Stufe 4 abzentrifugiert, mit Step 2-Puffer auf 4 mg anfängliche DNA/ml eingestellt, gut resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Dieser Schritt wird ein zweites Mal durchgeführt.
Das schließlich erhaltene Pellet wird als „Kernmatrix" bezeichnet, die gepoolten Überstände der einzelnen Kernmatrix-Isolierungsschritte als „Überstand".

2.2.10 DNA-Isolierungsmethode A

Kerne oder Kernmatrix (aus 200-300 Millionen Zellen) werden in 4 ml Lysepuffer aufgenommen und bei Raumtemperatur gegen Lysepuffer dialysiert, und zwar gegen zweimal 3 l für jeweils mindestens 4 Std. Der Überstand wird 1%ig an Sarcosyl gemacht und bei Raumtemperatur gegen zweimal 5 l für jeweils mindestens 4 Std. Durch diese Dialysen wird das vorhandene PMSF (welches in den Kernmatrix-Isolierungspuffern enthalten war) entfernt, da es die Proteinase K-Aktivität hemmt. Anschließend wird mit 200 µg Proteinase K/ml (aus einer 5 mg/ml H_2O-Stammlösung) versetzt und mit Lysepuffer auf 5,5 ml aufgefüllt. Es wird 18 Std. bei 37°C inkubiert. Die Lösung wird

in ein Polyallomer-Röhrchen des Beckman 60 Ti-Rotors überführt, dessen Gewicht vorher festgestellt worden war. Anschließend wird soviel bei 20°C in 0,1·SSC-Puffer gesättigtes CsCl zugegeben, bis das Röhrchen zusammen mit dem Inhalt ein Gewicht von 29,000 g + Röhrchengewicht aufweist. Das Zentrifugenröhrchen wird mit Paraffin aufgefüllt, verschlossen und in einer Beckman-Ultrazentrifuge L5-75 im Rotor 60 Ti bei 20°C während 20 Std. mit 41 000 rpm zentrifugiert. Beim Auslaufen des Rotors wird die Bremse unterhalb 15 000 rpm abgeschaltet. Es werden nach dem Anstechen des Röhrchens am Boden und Zugabe von Paraffin von oben her 1 ml-Fraktionen gesammelt. 5 µl-Aliquots werden nach der Tüpfelmethode (2.2.32) auf Radioaktivität überprüft. Die Radioaktivität enthaltenden Fraktionen werden gepoolt und in ein zweites Polyallomer-Röhrchen des 60 Ti-Rotors überführt. Es wird mit CsCl in 0,1·SSC-Puffer einer Dichte von 1,70 g/cm^3 unterschichtet, bis das Röhrchen zusammen mit dem Inhalt ein Gewicht von 29,85 g + Röhrchengewicht hat. Die Zentrifugation wird 36 Std. lang durchgeführt, ansonsten wird unter den gleichen Bedingungen wie oben zentrifugiert, fraktioniert und auf Radioaktivität überprüft. Die Radioaktivität enthaltenden, gepoolten Fraktionen werden 2mal gegen 0,1 TEBS-Puffer (jeweils 5 l, mindestens 4 Std.) und 1mal gegen 0,4 TEBS-Puffer (5 l, mindestens 4 Std.) dialysiert.

Während „nicht phenolisierte DNA" nicht weiter behandelt wird, wird „phenolisierte DNA" in einem Christ-Zentrifugenröhrchen mit festem NaCl unter Berücksichtigung des bereits vorhandenen bis zu 3 Mol/l und mit festem Harnstoff bis zu 5 Mol/l versetzt und zum Durchmischen 20 min bei Raumtemperatur am Rührmotor mit 30 rpm gedreht. Anschließend wird mit 1 Vol. Phenol pH 9 versetzt und 1 Std. mit 30 rpm gedreht. Die Phasen werden durch Zentrifugation in der Christ-Zentrifuge bei Raumtemperatur während 5 min bei maximaler Umdrehungsgeschwindigkeit getrennt. Die phenolische Phase befindet sich oben und kann abpipettiert werden. Die DNA-enthaltende wäßrige Phase wird 2mal gegen 0,4 TEBS-Puffer dialysiert.

2.2.11 DNA-Isolierungsmethode B

Kerne oder Kernmatrix (aus 200-300 Millionen Zellen) werden in 4 ml Lysepuffer aufgenommen und bei Raumtemperatur gegen Lysepuffer (wie in 2.2.10) dialysiert. Der Überstand wird 1%ig an Sarcosyl gemacht und bei Raumtemperatur gegen Lysepuffer (wie in 2.2.10) dialysiert. Anschließend wird mit 200 µg Proteinase K/ml (aus einer 5 mg/ml H_2O-Stammlösung) versetzt und 18 Std. bei 37°C inkubiert. Es wird in ein Christ-Zentrifugenröhrchen überführt, mit 1/3 Vol. Phenol pH 9 versetzt und 20 min bei Raumtemperatur am Rührmotor mit 30 rpm gedreht. Die Phasen werden durch Zentrifugation in der Christ-Zentrifuge bei Raumtemperatur während 5 min bei maximaler Umdrehungsgeschwindigkeit getrennt. Die DNA-enthaltende wäßrige Phase befindet sich oben. Sie wird abpipettiert und gegen RNase-Puffer dialysiert. Es wird in ein Christ-Zentrifugenröhrchen überführt und mit 50 µl RNase-Mix/ml 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird mit 1/3 Vol. Phenol pH 9 versetzt und wie oben weiterverarbeitet. Die nach der Phasentrennung erhaltene wäßrige Phase wird gegen 0,1 M Natriumphosphat-Puffer pH 7,0 dialysiert.

2.2.12 DNA-Isolierungsmethode C

Zur DNA-Isolierung nach Paoletti (76) werden $100 \cdot 10^6$ gewaschene Zellen in 5 ml 1·SSC-Puffer suspendiert und 3 Sekunden am Ultra-Turrax TP 18/2 (Janke & Kunkel, Staufen) homogenisiert. Der Ultra-Turrax wird mit 5 ml 1·SSC-Puffer gewaschen und die Waschflüssigkeit zum Homogenat gegeben. Es wird 10 min bei 10 000 g abzentrifugiert. Das Sediment wird in 5 ml 1·SSC-Puffer resuspendiert und der Homogenisationsvorgang noch 4mal wiederholt. Nach dem 4. Mal wird nicht mehr abzentrifugiert. Es wird 1/3 Vol. Phenol pH 9 zugegeben, 30 min bei 30 rpm am Rührmotor gedreht und zur Phasentrennung 5 min bei maximaler Umdrehungsgeschwindigkeit in der Christ-Zentrifuge abzentrifugiert. Die wäßrige Phase wird gegen RNase-Puffer dialysiert, mit 50 µl RNase-Mix/ml bei 37°C 30 min inkubiert und anschließend 18 Std. bei 37°C mit Proteinase K verdaut (200 µg/ml nach Zugabe von SDS bis

0,5%). Es folgt eine weitere Phenolisierung mit 1/3 Vol. Phenol pH 9 mit anschließender Dialyse gegen 0,1 TEBS-Puffer.

2.2.13 DNA-Äthanolfällung

Die NaCl-Konzentration einer DNA-Lösung wird auf 0,25 Mol/l gebracht, und es werden 2 Vol. 95% Äthanol zugegeben. Es wird gut durchgeschüttelt und in einem Trockeneis-Äthanol-Bad 20 min gefroren. Anschließend wird bei 10 000 g in der Christ-Zentrifuge abzentrifugiert und der Überstand verworfen.

2.2.14 DNA-Fragmentierung mittels Ultraschall

Die Beschallung von ca. 10 ml DNA-Lösung in 0,4 TEBS-Puffer erfolgt im Eisbad in speziellen Glasgefäßen, die eine gerichtete Umwälzung und effektive Kühlung gewährleisten. Die Beschallung erfolgt mittels eines Micro-Tips eines Branson-Sonifiers (Branson Instruments Inc., Danburg) bei Stufe 3. Es wird 12mal 10 Sekunden lang mit dazwischenliegenden Kühlperioden von 50 Sekunden durchgeführt (Beschalldauer: 2 min). Die erhaltenen Fragmentlängen betragen 500-700 Basenpaare (77).

2.2.15 DNA-Fragmentierung mittels Kryolyse

Die Kryolyse nach Lyskov und Moshkovsky (78) wurde nach den Angaben von Helftenbein (79) durchgeführt. Die nach 2.2.10 gereinigte DNA-Lösung wird auf eine Konzentration von 50 µg/ml 0,4 TEBS-Puffer gebracht und in eine Kammer überführt, die durch zwei vergoldete Messingplatten (15 cm ø), gefettete Styropordichtungen und 1 mm-Abstandhalter gebildet wird. Die gefüllte Kammer wird in eine Apparatur eingespannt, welche sie in einem programmierbaren Rhythmus abwechselnd in ein Thermosgefäß mit flüssigem Stickstoff (-196°C) und in ein Wasserbad von 20°C eintaucht. Die Gefrierzeit wird auf 1,5 min eingestellt, die Auftauzeit auf 2,5 min. Es werden 120 Kryolysezyklen durchgeführt.

2.2.16 Verdau von Einzelstrang-DNA mit der Nuclease S1

Die DNA-Lösung wird gegen 0,25 M NaCl, 50 mM Natriumacetat, 1 mM $ZnSO_4$ pH 4,9 dialysiert und mit 100 Einheiten Nuclease S1/µg DNA 30 min bei 37°C verdaut. Unter diesen Bedingungen wird Doppelstrang-DNA durch das Enzym nicht abgebaut.

2.2.17 Nitrocellulose-Chromatographie an Säulen

Die Chromatographie wird nach Probst et al. (80) durchgeführt. Zum Füllen der Säulen wird die Nitrocellulose-Suspension (2.1.11) mit einem passenden Glasstab in einer Einmalspritze fest gepackt. Die Kapazität einer 2 ml-Säule beträgt nach früheren Ergebnissen ca. 1-2 mg DNA.
Die Säule wird mit dem 5fachen Säulenvolumen 0,4 TEBS-Puffer äquilibriert. Die DNA-Probe, die gegen 0,4 TEBS-Puffer dialysiert wurde, wird mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/3 min aufgetragen. Mit der gleichen Geschwindigkeit wird mit dem 3fachen Säulenvolumen 0,4 TEBS-Puffer nachgewaschen (Auftrag + Waschflüssigkeit = TEBS-Fraktion). Anschließend wird ebenfalls mit der gleichen Geschwindigkeit mit dem 8fachen Säulenvolumen einer SDS-Lösung (0,5% SDS, 1 mM EDTA, mit Tris auf pH 6,7 eingestellt) eluiert (=SDS-Fraktion). Die Nitrocellulose-Säulenfüllung wird zur Bestimmung der nichteluierbaren Radioaktivität nach 2.2.37 verwendet.

2.2.18 Nitrocellulose-Chromatographie an Filtern

Der Filterbindungstest wird nach Stumpf (81) an einer Absaugapparatur durchgeführt, die es gestattet, bis zu 20 Proben gleichzeitig mit kontrolliertem Unterdruck abzusaugen. Es werden Membranfilter aus reiner Nitrocellulose der Firma Sartorius vom Typ SM 11 308 mit einer Porengröße von 0,15 µm und einem Durchmesser von 24 mm verwendet. Diese werden 1 Std. vor Gebrauch in 0,4 TEBS-Puffer eingeweicht. Vor dem Auftragen der gegen den gleichen Puffer dialysierten DNA-Proben werden 5 ml 0,4 TEBS-Puffer durchgesaugt, und nachdem die DNA durchgelaufen ist, mit 10 ml des gleichen Puffers nachgewaschen. Die Durchflußgeschwindigkeit beträgt stets 1 ml/min, was einem Unterdruck von 15 mm Hg entspricht.

Die am Filter gebundene Radioaktivität, die bei der Säulenchromatographie nach 2.2.17 der Summe aus der SDS-Fraktion und der irreversibel auf der Säule verbliebenen Radioaktivität entspricht, wird nach 2.2.36 bestimmt.

2.2.19 Hydroxyapatit-Chromatographie

Eine 2 ml-Hydroxyapatit-Säule (ø 9 mm) wird mit 10 Vol. 0,05 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0 äquilibriert. Die DNA-Lösung, die gegen den gleichen Puffer dialysiert wurde, wird mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/2,5 min aufgetragen, und es wird mit dem doppelten Säulenvolumen desselben Puffers nachgewaschen. Anschließend wird ein 24 ml-Gradient 0,05-0,4 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0 angelegt. Die Elutionsgeschwindigkeit beträgt 1 ml/2,5 min, die Fraktionsgröße 0,8 ml. Frühere Ergebnisse zeigen, daß die Kapazität einer 2 ml-Säule 400 µg DNA beträgt. Die Bestimmung der Phosphatkonzentration in den einzelnen Fraktionen erfolgt nach Chen et al. (82).

2.2.20 Thermische Hydroxyapatit-Chromatographie

Die thermische Hydroxyapatit-Chromatographie wird nach Probst et al. (64) durchgeführt. Sie erlaubt eine Trennung und Fraktionierung kurzer DNA-Ketten. 0,8·20 cm-Glassäulen befinden sich in einem Glycerinbad und sind mit einem 2 ml-Hydroxyapatit-Bett gefüllt. Der Säulenausfluß wird durch ein Loch im Boden des Glycerinbades geleitet und ist mit einer peristaltischen Pumpe verbunden, welche auf die Geschwindigkeit 1 ml/2,5 min eingestellt wird. Das Säulenbett wird mit 3 Vol. 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0 gewaschen. Anschließend wird die DNA-Lösung (weniger als 0,4 mg DNA) in 2 Bettvolumina des 0,1 M Natriumphosphatpuffers aufgetragen und mit 1 ml des gleichen Puffers nachgewaschen. Auf die Säule wird eine dünne Hydroxyapatitschicht aufgetragen und mit 2 Bettvolumina nachgespült (Voreluat E1). Anschließend wird mit jeweils 2,5 Bettvolumina nach folgendem Programm eluiert: Voreluat E2: 0,16 M Natriumphosphat pH 7,0. Voreluat E3: 0,12 M Natriumphosphat, 5 M $NaClO_4$ pH 5,5 (=Heizpuffer). Die

Säulen werden mit Heizpuffer gefüllt und durch das Glycerin des Glycerinbades bedeckt. Dieses wird mit 1°C/min bis zur gewünschten Temperatur erhitzt und 10 min bei der Temperatur gehalten. Anschließend wird mit 2,5 Bettvolumina eluiert. Das Eluat wird in einem Gefäß aufgefangen, in dem 100 µg Carrier-DNA (hergestellt nach 2.2.12) vorgelegt sind.
Bei der thermischen Hydroxyapatit-Chromatographie zur anschließenden Proteinjodierung nach 2.2.6 wird als Carrier-DNA λ-DNA aus dem Bakteriophagen Lambda cI 857 Sam 7 (Boehringer Mannheim) vorgelegt, da diese DNA keine kovalent gebundenen Proteine enthält.

2.2.21 Aufnahme einer c_0t-Kurve (83, 84)
Den ^{32}P-markierten DNA-Fraktionen der thermischen Hydroxyapatit-Chromatographie (2.2.20) wird ^{3}H-markierte Referenz-DNA (2.1.2) sowie nicht radioaktiv markierte Carrier-DNA zugesetzt. Es wird gegen 0,01 M Natriumacetat pH 5,5, 0,3 M NaCl, 0,002% Natriumazid dialysiert und nach 2.2.14 ultraschallbehandelt. Der Ansatz wird in zwei Hälften geteilt, jeweils die OD_{260} gemessen und jeweils so viel nicht radioaktive Carrier-DNA zugegeben, bis die OD_{260}-Werte 9,72 (Ansatz A) bzw. 9,675 (Ansatz B) betragen. Anschließend wird eine Äthanolfällung nach 2.2.13 angeschlossen. Die Pellets werden in 5,4 ml 0,12 M Natriumphosphatpuffer pH 6,8, 0,1% SDS (=0,12 M PB) aufgenommen (Ansatz A) und auf sechs Eppendorf-Cups à 0,9 ml verteilt bzw. in 0,45 ml 0,4 M Natriumphosphatpuffer pH 6,8, 0,1% SDS (=0,4 M PB) aufgenommen (Ansatz B). Auf die 0,45 ml des Ansatzes B wird Paraffinöl aufgeschichtet, welches durch Aufkochen in 0,4 M PB mit diesem Puffer gesättigt worden war. Die Eppendorf-Cups werden für 5 min in kochendes Wasser gegeben und anschließend in ein 57°C warmes Wasserbad, von wo aus sie auf die Säulen nach bestimmten Zeiten aufgetragen werden. Die Säulen enthalten ein 2 ml-Hydroxyapatit-Bett, wurden mit 10 ml 0,12 M PB (57°C) äquilibriert und befinden sich in einem 57°C warmen Glycerinbad; kurz vor Probenauftrag läßt man sie trockenlaufen. Die Probeentnahme wird folgendermaßen durchgeführt:

Die Eppendorf-Cups von Ansatz A erhalten zusätzlich 1,1 ml 0,12 M PB einer Temperatur von 57°C; es wird schnell gemischt und auf die Säule aufgetragen. Dieses erfolgt sofort sowie 0,6; 6; 9,2; 31 und 62 min nachdem die Proben nach dem Kochen ins 57°C-Wasserbad gestellt werden. Ferner werden aus Ansatz B jeweils 75 µl nach 14; 53 und 105 min sowie nach 9 und 15,5 Std. entnommen, in 2 ml 0,12 M PB einer Temperatur von 57°C gegeben und sofort auf die Säule aufgetragen. Jede Säule wird 3mal mit 2 ml 0,12 M PB (57°C) gespült, wobei man die Säule nach jeder Spülung trockenlaufen läßt. Danach wird die Temperatur des Glycerinbades auf 98°C erhöht, und es wird 3mal mit 2 ml 0,4 M PB (98°C) gespült. Die 57°C- und 98°C-Eluate werden voneinander getrennt aufgefangen und auf ihre Radioaktivität überprüft. Der Prozentanteil nichtreassoziierter DNA in jeder Probe wird mittels folgender Formel bestimmt, wobei N den Prozentanteil darstellt:

$$\frac{\text{Radioaktivität (Durchlauf + 57°C-Spülungen)}}{\text{Radioaktivität (Durchlauf + 57°C- + 98°C-Spülungen)}} \cdot 100 = N$$

2.2.22 Filterhybridisierung

24 mm ø-Nitrocellulosefilter (Sartorius SM 11 308) werden über Nacht in 2·SSC-Puffer eingeweicht. 40 µl jeder Gradientenfraktion aus 2.2.25 (^{3}H-langzeitmarkierte DNA; in der Kultur befinden sich 0,5 µCi/ml ^{3}H-dThd sowie $5 \cdot 10^{-6}$ M nicht radioaktiv markiertes dThd) werden mit 400 µl 20·SSC-Puffer und 440 µl 1 N NaOH versetzt und 30 min bei Raumtemperatur gehalten. Die Zugabe des 10fachen Volumens an 20·SSC-Puffer bewirkt die Komplexierung von Ag^+ (85). Anschließend werden 880 µl einer Lösung aus 1 N HCl und 1 M Tris/HCl pH 8,0 im Volumenverhältnis 1 : 1 zugegeben. Die insgesamt 1,76 ml werden auf die Nitrocellulosefilter mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/min gebracht, wobei die gleiche Apparatur wie in 2.2.18 verwendet wird. Die Filter werden mit 10 ml 2·SSC-Puffer nachgespült und 10 min bei 90°C getrocknet. Die weiteren Arbeitsgänge erfolgen nach (86): Die Filter werden in einen verschließbaren Erlenmeyerkolben überführt und dieser

mit 50 ml Vorhybridisierungslösung gefüllt. Anschließend wird bei 42°C unter leichtem Schütteln 6 Std. inkubiert und nach Ablauf dieser Zeit die Lösung so weit abgenommen, daß sie gerade die Filter bedeckt. Die ^{32}P-markierte DNA wird 5 min auf 100°C erhitzt und zu den Filtern gegeben. Es wird 48 Std. bei 42°C inkubiert. Danach wird die Lösung abgegossen, und die Filter werden 4mal 5 min in jeweils 500 ml 2·SSC, 0,1% SDS bei Raumtemperatur gewaschen, wobei die Filter nicht eintrocknen dürfen. Anschließend werden die Filter 2mal 1 Std. in 300 ml 1·SSC, 0,1% SDS bei 68°C gewaschen. Die Filter werden schließlich 10 min bei 90°C getrocknet und ausgezählt.

2.2.23 Sucrosegradienten-Zonensedimentation

Der S-Wert von DNA-Proben, die nach 2.2.10 oder 2.2.20 erhalten werden, wird mittels Zentrifugation in Sucrosegradienten ermittelt.

Die Sucrosegradienten werden mit einem ISCO Gradient Former, Modell 570 (Instrument Specialities Company, Lincoln) hergestellt. Es handelt sich um 5-30% lineare Sucrosegradienten mit 0,5 ml vorgelegtem 60% Sucrose-Kissen. Der verwendete Puffer besteht bei den neutralen Gradienten aus 10 mM Tris/HCl pH 7,8; 0,2 M NaCl; 1 mM EDTA und bei den alkalischen Gradienten aus 0,8 M NaCl; 0,2 M NaOH; 1 mM EDTA. Das Gradientenvolumen beträgt 12 ml, das Auftragsvolumen 0,5 ml. Die Ultrazentrifugation erfolgt im SW 40 Ti-Rotor bei 39 000 rpm und 4°C.

Die Gradienten werden mit einem Density Gradient Fractionator, Modell 640 (ISCO, Lincoln) durch Unterschichten mit methylenblauer 65%iger Sucrose vom Meniskus her fraktioniert und in 0,4 ml-Fraktionen bei einer Pumpgeschwindigkeit von 3 ml/min gesammelt.

2.2.24 Alkalische CsCl-Gleichgewichtsdichtezentrifugation

Die DNA-Lösung wird in einem Polyallomer-Röhrchen des 50 Ti-Rotors mit destilliertem Wasser auf ein Gewicht von 5,97 g gebracht, wobei die schließlich erhaltene Lösung 1 mM an EDTA und 0,1 M an NaOH ist. Es werden 8,12 g CsCl zugegeben und bis zum vollständigen Lösen gemischt. Der Brechungsindex

n_{20}= 1,4038 entspricht einer Dichte von 1,75 g/cm^3. Anschließend wird das Röhrchen mit Paraffin aufgefüllt. Die Zentrifugation erfolgt in einem 50 Ti-Rotor der Firma Beckman bei 25°C und 43 000 rpm für 36 Std. Nach Ablauf der Zentrifugationsdauer wird der Rotor bis zu 15 000 rpm abgebremst und dann ohne Bremse auslaufen gelassen.
Die Gradienten werden nach Anstechen der Zentrifugenröhrchen am Boden durch Überschichten mit Paraffin in 0,25 ml-Fraktionen fraktioniert. Die erste und letzte sowie jede fünfte Fraktion werden an einem Abbé-Refraktometer der Firma Zeiss auf ihren Brechungsindex untersucht, wobei jeweils 5 µl-Aliquots der Fraktionen dazu verwendet werden. Die Umrechnung auf die Dichte erfolgt nach der Beziehung (87):

$$\rho = 10{,}8601 \cdot n - 13{,}4974$$

2.2.25 <u>Ag^+/Cs_2SO_4-Gleichgewichtsdichtezentrifugation</u>
Die DNA-Lösung wird chloridfrei gegen 10 mM Boratpuffer pH 9,2 (in bidest. Wasser) dialysiert und bis zu einem Probengewicht von 7 g in ein Polyallomer-Röhrchen des 50 Ti-Rotors gefüllt. Es werden ^{3}H-markierte sowie nicht radioaktiv markierte Ehrlich-Ascites-DNA, die nach 2.2.12 isoliert und gegen den Boratpuffer chloridfrei dialysiert worden waren, bis zu einer Gesamtmenge von 150 µg DNA zugegeben. Dieser Lösung werden 62 µl einer 2 mM $AgClO_4$-Lösung zugegeben, so daß sich ein R_f-Wert (=Ag^+/DNA-Phosphat) von 0,27 ergibt. Dabei wird bei der Berechnung berücksichtigt, daß 50 µg Ehrlich-Ascites-DNA einem Wert von $1{,}517 \cdot 10^{-7}$ Mol PO_4^{3-} entsprechen. Die $AgClO_4$-Lösung wird immer frisch aus einer 200 mM Stammlösung hergestellt und vor Lichteinwirkung geschützt. Da $AgClO_4$ hygroskopisch und eine genaue Einwaage nicht möglich ist, wird die Molarität elektrogravimetrisch durch Silberabscheidung an einer Platinelektrode in schwefelsaurer Lösung bei 80°C und 1,3 V bestimmt.
Das Zentrifugenröhrchen wird mit 10 mM Boratpuffer pH 9,2 (in bidest. Wasser) auf 7,50 g aufgefüllt und mit 5,71 g festem Cs_2SO_4 versetzt. Es wird bis zum vollständigen Lösen

gemischt, mit Paraffin aufgefüllt und bei 25°C und 45 000 rpm für 72 Std. im 50 Ti-Rotor der Firma Beckman zentrifugiert. Nach Ablauf der Zentrifugationsdauer wird der Rotor bis 15 000 rpm abgebremst und dann ohne Bremse auslaufen gelassen. Fraktionierung und Brechungsindex-Bestimmung erfolgen wie in 2.2.24. Die Umrechnung auf die Dichte erfolgt nach der Beziehung (87):

$$\rho = 13{,}6986 \cdot n - 17{,}3233$$

2.2.26 DNA-Elektrophorese in einem nicht denaturierenden 5%igen Polyacrylamidgel

Die DNA-Elektrophorese erfolgt nach (88) in einem 165·150·5 mm-Gel in einem UltraPhor (Colora-Meßtechnik, Lorch). Das 5%ige Polyacrylamidgel, welches die Trennung von DNA-Fragmenten bis zu 1000 Nucleotidpaaren erlaubt, enthält folgende Komponenten: 7,5 g Acrylamid, 0,3 g Bis, 98 mg Ammoniumpersulfat, 15 ml Gelpuffer (= 0,9 M Tris/HCl pH 8,2; 0,9 M Borsäure; 25 mM EDTA), destilliertes Wasser ad 150 ml. Die Polymerisation wird durch Zugabe von 50 µl TEMED gestartet. Als Elektrodenpuffer dient 0,1·Gelpuffer.
Die Proben werden mit dem gleichen Volumen 50% Glycerin, das 0,05% Bromphenolblau (BPB) sowie 0,05% Xylen-Cyanol-FF (XCFF) als Farbstoffmarker enthält, versetzt. Die Elektrophorese wird bei 200 V so lange durchgeführt, bis BPB ca. 8 cm weit gewandert ist.

2.2.27 DNA-Elektrophorese in einem denaturierenden 5%igen Formamid-Polyacrylamidgel

Es werden die gleichen Gel-Dimensionen und die gleiche Apparatur wie bei 2.2.26 verwendet. Das Gel erlaubt die Trennung von DNA-Fragmenten bis zu 1000 Nucleotiden und wird folgendermaßen hergestellt: 6,38 g Acrylamid; 1,12 g Bis; 2 ml einer Lösung aus 0,422 g $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$, 80 mg $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 200 mg Ammoniumpersulfat; mit Formamid auf 150 ml auffüllen. Die Polymerisation wird durch Zugabe von 150 µl TEMED gestartet. Als Elektrodenpuffer dient 0,02 M Natriumphosphatpuffer pH 7,5.

Die DNA-Proben werden mit dem 10fachen Volumen Formamid versetzt, 5 min bei 100°C erhitzt und dann mit Glycerin/BPB/XCFF wie in 2.2.26 versetzt und unter den gleichen Bedingungen der Elektrophorese unterworfen.

2.2.28 Allgemeines zur Messung der Radioaktivität

Alle β-Strahlen emittierenden Proben werden in einem Tri-Carb Liquid Spectrometer, Modell 2450 (Packard Instrument Co. Inc., Downers Grove) gemessen. Die Messung von ^{125}J erfolgt in einem MR 480 Automatic Gamma Counting System (Kontron, Zürich).
Die Berechnung der Zählausbeute sowie der Kreuzkontamination im Fall doppelmarkierter Proben erfolgt mit dem programmierbaren Taschenrechner TI 59 von Texas Instruments. Es wird bei einfachmarkierten ^{3}H oder ^{14}C-Proben nach dem Auszählen mit 100 µl des jeweiligen Toluol-Standards versetzt und erneut gezählt. Bei $^{3}H/^{14}C$-doppelmarkierten Proben wird nach Zählung zunächst mit 100 µl des ^{14}C-Toluol-Standards versetzt und erneut ausgezählt und dann mit 100 µl des ^{3}H-Toluol-Standards und ein weiteres Mal ausgezählt.

2.2.29 Radioaktivität des säurefällbaren Materials von ganzen Zellen

Ein Aliquot von Zellen wird entnommen und zweimal mit eiskalter Hanks-Lösung gewaschen. Danach wird mit 5 ml eiskalter 5% TCA versetzt, nach 30 min bei 0°C abzentrifugiert (10 min, 500 g), der Überstand verworfen, das Zellpellet gevortext, 1,5 ml eiskalte 0,2 N NaOH-Lösung zugegeben sowie nach weiteren 30 min im Eisbad 2 ml eiskalte 10% TCA. Nach 30 min bei 0°C wird das gefällte Material auf Glasfaserfiltern gesammelt und 10 min bei 90°C getrocknet. Danach wird mit 5 ml Toluol-Szintillator ausgezählt. Soll die Zählausbeute bestimmt werden, so werden die Filter mit 0,5 ml Hyamine über Nacht bei 37°C lichtgeschützt in den Szintillationsfläschchen inkubiert, 10 ml Toluol-Szintillator zugegeben, kräftig gevortext und nach Abklingen einer eventuell auftretenden Chemolumineszenz ausgezählt.

2.2.30 Radioaktivität des säurelöslichen Materials von ganzen Zellen

Es wird ein Aliquot des 500 g-Überstandes von 2.2.29 entnommen. 0,2-0,5 ml werden mit 10 ml Ready-Solv HP, in einigen Fällen auch mit Triton-Szintillator, auf einem Vortex gut durchgemischt und ausgezählt. Der Verbrauch von Radioaktivität im Medium wird durch Messung von 0,2 ml des Mediumüberstandes in 10 ml Ready-Solv HP ermittelt.

2.2.31 Radioaktivität von säurefällbarem Material in wäßrigen DNA-Lösungen

Wäßrige 0,4 ml-DNA-Proben (vorwiegend 0,4 ml-Fraktionen von Sucrosegradienten oder mit dest. Wasser auf 0,4 ml aufgefüllte 0,25 ml-Fraktionen von CsCl- oder Cs_2SO_4-Gradienten) werden im Eisbad mit 20 µg Carrier-DNA (Kalbsthymus-DNA in 0,1·SSC-Puffer) und 250µl 15% TCA versetzt. Die Präzipitate werden nach 30 min bei 0°C auf Nitrocellulose-Membranfiltern (BA 90, Schleicher & Schüll) oder Glasfaserfiltern (GF/C, Whatman) gesammelt, mit 1% TCA gewaschen, 10 min bei 90°C getrocknet und nach Zugabe von 5 ml Toluol-Szintillator ausgezählt. Soll die Zählausbeute bestimmt werden, wird nach 2.2.29 vorgegangen.

2.2.32 Radioaktivitätsbestimmung nach der Tüpfelmethode

Papierfilter werden mit einem harten Bleistift durchnumeriert. Anschließend werden sie mit 20% TCA in Äther getränkt und getrocknet. Auf jeden Filter werden 5 µl-Aliquots aus CsCl-Gradienten pipettiert und trocknen gelassen. Dann werden die Filter auf einem Glassieb nacheinander in 5% TCA, Äthanol und Äther gewaschen, getrocknet und nach Zugabe von 5 ml Toluol-Szintillator ausgezählt.

2.2.33 Radioaktivität von ^{32}P-markierten Proben

Wäßrige Proben, die ausschließlich ^{32}P-markiert sind, werden aufgrund ihrer Čerenkov-Strahlung direkt im ^{3}H-Kanal des Szintillationszählers gemessen. ^{3}H/^{32}P-doppelmarkierte Proben werden nach 2.2.31 behandelt und ausgezählt.

2.2.34 Radioaktivität von ^{125}J-markierten Proben

^{125}J-markierte DNA-Proben werden nach 2.2.31 auf Glasfaserfiltern gesammelt. Die getrockneten Filter werden mit einem Glasstab in ein Einmalreagenzglas so weit gestampft, daß in allen Reagenzgläsern die gleiche Geometrie vorliegt. Anschließend wird ohne jede weitere Behandlung (auch bei ^{32}P/^{125}J-doppelmarkierten Proben) direkt im Gamma-Counter gemessen.

2.2.35 Radioaktivität von Polyacrylamidgelen

Die Gele werden in 4 mm-Scheiben geschnitten. Enthalten die Gele nur ^{32}P-markierte Proben, so werden die einzelnen Gelscheiben mit 5 ml dest. Wasser versetzt und nach 2.2.33 gemessen.

Enthalten die Gele ^{3}H- oder ^{14}C-markierte Proben, so werden die Gelscheiben in Szintillationsfläschchen bei 70°C über Nacht getrocknet, mit 0,5 ml 30% H_2O_2 versetzt und so lange bei 70°C in den verschlossenen Fläschchen inkubiert, bis sich die Gelscheiben komplett aufgelöst haben. Nach Zugabe von 0,5 ml leicht angesäuerten Wassers und 10 ml Triton-Szintillator wird die Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen.

2.2.36 Bestimmung der Nitrocellulose-bindenden Radioaktivität im Filterbindungstest

Zur Bestimmung der säurefällbaren Gesamtradioaktivität wird wie bei 2.2.31 verfahren, mit dem Unterschied, daß zur Vermeidung von Quenching-Effekten mit 0,2 ml 1,5 N KOH pro ml DNA-Lösung versetzt wird.

Die nach der Passage der DNA-Lösung und dem Waschen mit 0,4 TEBS-Puffer auf dem Filter verbleibende Radioaktivität wird nach dem Trocknen des Filters mit 5 ml Toluol-Szintillator ausgezählt.

2.2.37 Bestimmung der Radioaktivität von nichteluierbarer DNA auf Nitrocellulose-Säulen

Die gut trocken gepreßte Säulenfüllung wird in einem Szin-

tillationsfläschchen mit 20 ml Ready-Solv HP so lange gevortext, bis alles gelöst ist. Anschließend wird direkt ausgezählt.

2.2.38 Bestimmung der Radioaktivität von nichteluierbarer DNA auf Hydroxyapatit-Säulen

Das Säulenmaterial wird mit wenig Wasser aus der Säule gespült, es werden 20 µg Carrier-DNA (Kalbsthymus-DNA in 0,1· SSC-Puffer) und so viel 50% TCA zugegeben, bis alles gelöst ist. Nach 30 min im Eisbad wird analog 2.2.31 verfahren.

2.2.39 Isolierung der Restriktionsendonuclease Bsp RI

Bacillus sphaericus R wird im Medium 2.1.6 bis zu OD_{550}= 2,8 wachsen gelassen und dann geerntet. Die Isolierung des Enzyms erfolgt nach (89). Im Gegensatz zu dieser Literaturstelle wurde bereits zu einem früheren Zeitpunkt eine gewisse Vorreinigung erreicht, indem nicht der Niederschlag der Ammoniumsulfatfällung bei 70% Sättigung weiterverwendet wurde, sondern ausschließlich der Niederschlag von 40-60% Sättigung (Pellets unter 40% und über 60% wurden verworfen).

Die Abwesenheit störender Nucleasen in der Enzympräparation wird durch 16 Std.-Verdau von 10 Einheiten Bsp RI/µg Lambda-DNA mit anschließender Elektrophorese nachgewiesen. Das Spaltmuster unter diesen Bedingungen war das gleiche wie nach einem 1 Std.-Verdau mit 1 Einheit Bsp RI/µg Lambda-DNA.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 Darstellung matrixassoziierter DNA-Fragmente

3.1.1 Einkreisung der DNA-Anheftungsstelle an der Kernmatrix

Wie bereits in der Einleitung beschrieben stellt man sich die DNA in Schleifen („Loops") organisiert vor, die an der Kernmatrix verankert sind (14, 49-57). Um die Anheftungsstelle näher zu charakterisieren, ist es daher notwendig, möglichst viel DNA durch Verdau mit einer Nuclease von der Kernmatrix abzutrennen. Wird ein Loop an zwei verschiedenen Stellen geschnitten, so werden diejenigen Bereiche, die nicht unmittelbar matrixgebunden sind, in der nachfolgenden Aufarbeitung (2.2.9) von den matrixgebundenen DNA-Stücken getrennt. Je intensiver der Verdau mit der Nuclease wird, desto kleiner werden die matrixgebundenen DNA-Abschnitte. Um diese möglichst präzise charakterisieren zu können, ist eine geringe Länge der Stücke notwendig.

Der Verdau der Kerne kann mit unterschiedlichen Nucleasen erfolgen. In der Literatur wurden Verdaus mit anschließender Matrixisolierung beschrieben, die sich der DNase I (60), Micrococcus-Nuclease (59) oder Eco RI-Restriktionsendonuclease (49) bedienten. Versucht man jedoch, die Anheftungsstellen in genügend großer Menge zu isolieren, so verbietet sich die Anwendung der drei genannten Enzyme. DNase I und Micrococcus-Nuclease sind problematisch, wenn erhaltene Fragmentgrößenverteilungen reproduziert werden sollen. Daher sind grundsätzlich Serien mit abgestufter Verdauintensität erforderlich, wenn ein bestimmter gewünschter Fragmentierungsgrad erreicht werden soll. Da aber die Fragmentierung nur ein Schritt in einem aufwendigen Gesamtversuch ist, verbieten sich an dieser Stelle „Serien". Günstiger sind Restriktionsenzyme vom Typ II, da diese bei einer bestimmten Erkennungssequenz die DNA-Doppelstränge schneiden (90). Dadurch braucht man einen schlecht reproduzierbaren Verdau nicht zu befürchten. Eco RI hat, wie viele andere

Restriktionsendonucleasen, eine sechs Nucleotide lange Erkennungssequenz, so daß bei stochastischer Sequenzverteilung in der DNA eine Spaltstelle durchschnittlich alle 4096 Basenpaare auftreten müßte. Restriktionsenzyme mit einer „Vierer-Erkennungssequenz" spalten unter den gleichen Bedingungen alle 256 Basenpaare. Diese Werte, die für „nackte" DNA gelten, müssen für Chromatin, d.h. unter Berücksichtigung der Nucleosomen-Struktur, mit einem Wert von ca. 4-5 multipliziert werden. Hier wurde das Restriktionsenzym Bsp RI gewählt, das die Sequenz 5' GGCC 3' auf der DNA erkennt.

Werden Kerne mit Bsp RI verdaut und anschließend die Kernmatrix isoliert, so erhält man einen stets gleichbleibenden Anteil matrixgebundener DNA (Tabelle 1) sowie reproduzierbare Fragmentgrößenverteilungen (Abb. 3-5).

Tabelle 1
Anteil ^{3}H-dThd-pulsmarkierter und ^{14}C-dThd langzeitmarkierter DNA, der matrixgebunden ist. Mittelwerte und Standardabweichungen aus 5 Versuchen.

	^{3}H-dThd-4 min-Pulsmarkierung	^{14}C-dThd-20 Std.-Langzeitmarkierung
% der an der Matrix verbleibenden Radioaktivität	21,9 ± 9,9 (n = 5)	2,62 ± 0,57 (n = 5)

Bei einer 20stündigen Markierung mit ^{14}C-Thymidin wird die DNA gleichmäßig markiert. Nach Bsp RI-Verdau verbleiben lediglich 2-3% der Radioaktivität an der Kernmatrix. Um auszuschließen, daß dabei replizierende DNA markiert wird, wurde teilweise ein Chase mit Überschuß an kaltem Thymidin angeschlossen (2.2.4). Auch in diesen Fällen betrug der Anteil matrixgebundener Radioaktivität 2-3%.

Abb. 3-5: Sedimentation von Kern-, Überstand- und Matrix-DNA in einem 5-30% linearen Sucrosegradienten (10 mM Tris/HCl pH 7,8, 0,2 M NaCl, 1 mM EDTA) mit 0,5 ml 60% Sucrosekissen. Zentrifugationsbedingungen: SW 40 Ti-Rotor, 39 000 rpm, 4°C, 8 Std. Sedimentation von links nach rechts. Die Pfeile mar-

kieren die Lage von Eco RI-Fragmenten von λplac5-DNA sowie von λplac5-DNA mit den angegebenen S-Werten, die in einem parallelen Zentrifugenröhrchen mit sedimentiert wurden.
——= ^{3}H-DNA (4 min-Puls); —— = ^{14}C-DNA (20 Std.-Markierung)

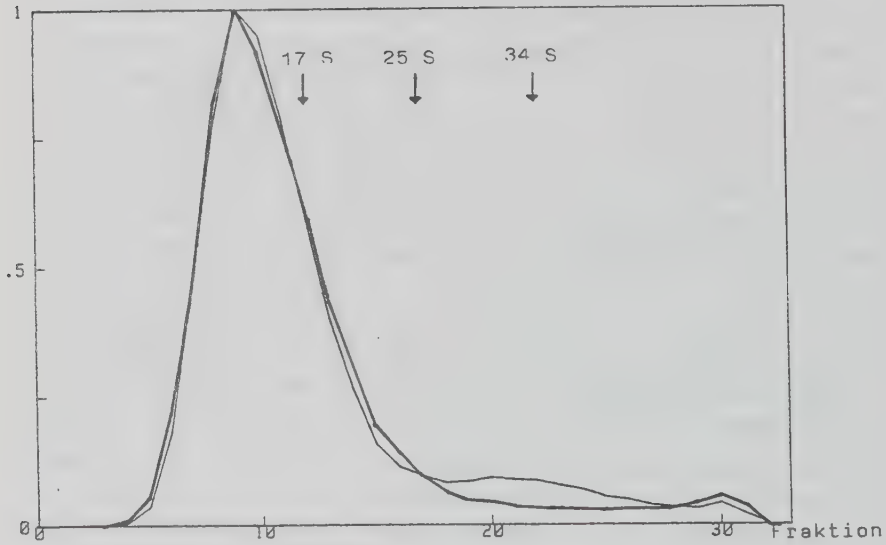

Abb. 3: Kern-DNA. cpm im Maximum: ^{3}H = 37 492; ^{14}C = 16 342

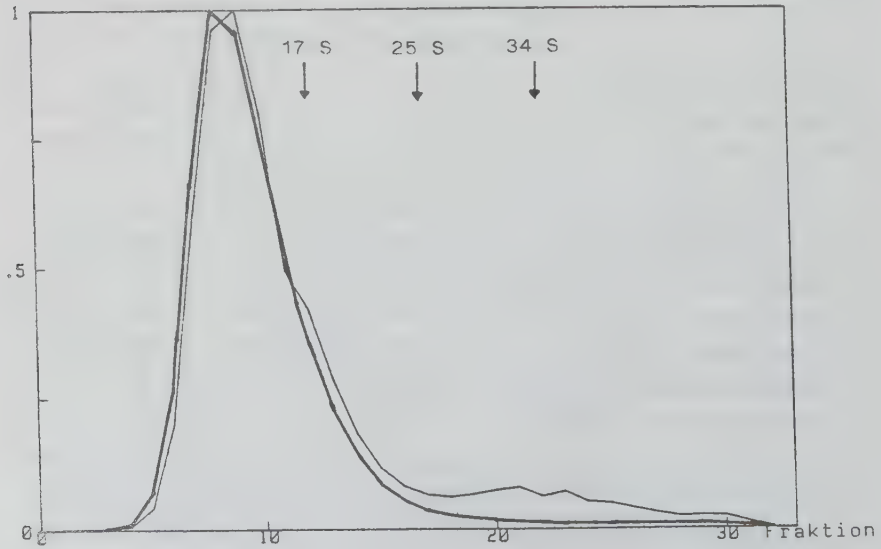

Abb. 4: Überstand-DNA. cpm im Max.: ^{3}H = 96 534; ^{14}C = 32 549

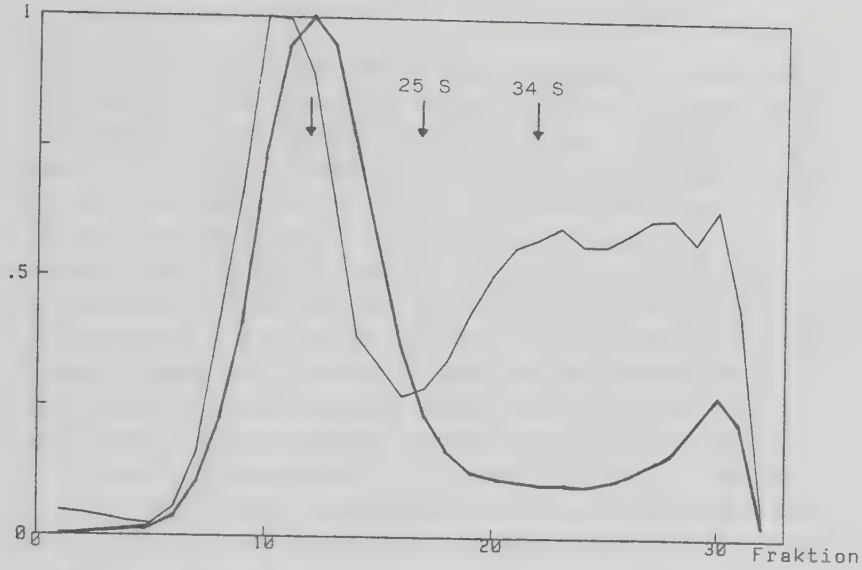

Abb. 5: Matrix-DNA. cpm im Maximum: ^{3}H = 65 668; ^{14}C = 1 774

3.1.2 Bevorzugte Anheftung replizierender DNA an die Kernmatrix

In der Literatur war beschrieben worden, daß replizierende DNA in verstärktem Maße an der Kernmatrix lokalisiert ist (11, 16, 17, 19, 50, 91). Es wurde überprüft, ob das auch für Ehrlich-Ascites-Tumorzellen zutrifft. Daher wurden Pulse der Dauer 1 min, 2 min und 4 min durchgeführt. Der Anteil matrixgebundener Radioaktivität findet sich in Tabelle 2.

Tabelle 2
Anteil ^{3}H-dThd-pulsmarkierter DNA an der Kernmatrix bei unterschiedlichen Pulsdauern. Werte jeweils eines Versuches.

	1 min-Puls	2 min-Puls	4 min-Puls
% der an der Matrix verbleibenden Radioaktivität	46,32	39,10	27,46
Anreicherung der Pulsmarkierung ($^{3}H/^{14}C$)*	18,1 x	15,0 x	10,1 x

*1 x = % der an der Matrix verbliebenen Radioaktivität von ^{14}C-dThd-20 Std.-markierter DNA

Es konnte somit gezeigt werden, daß auch bei Ehrlich-Ascites-Tumorzellen die Replikation bevorzugt an der Kernmatrix erfolgt. Geht man davon aus, daß sich der Replikationskomplex an der Matrix befindet, so werden diejenigen Bereiche, die bereits repliziert worden sind, in den Loop-Bereich und somit weg von der Kernmatrix wandern. Aufgrund dessen sollte man erwarten, daß mit zunehmender Pulsdauer immer mehr replizierte DNA im Loop-Bereich von der Restriktionsendonuclease geschnitten und dadurch von der Kernmatrix getrennt wird. Die Ergebnisse aus Tabelle 2 bestätigen diese Erwartung. Wird der Puls lange genug durchgeführt, so findet man keinen Unterschied mehr zwischen pulsmarkierter replizierender DNA und langzeitmarkierter Gesamt-DNA. Das gleiche Ergebnis erhält man, wenn man an einen kurzzeitigen Puls einen Chase anschließt (wurde hier nicht durchgeführt).

Die zuletzt aufgeführte Beobachtung ist nur dadurch zu erklären, daß die Replikationsgabeln an die Matrix gebunden sind (16). Ob Initiations- oder Terminationsstrukturen ebenfalls matrixgebunden sind ist umstritten. Während bisher angenommen wurde, daß zusätzlich zu den Replikationsgabeln die Initiationsstrukturen an der Matrix lokalisiert sind (14, 91), deuten neue Ergebnisse darauf hin, daß Initiationsstrukturen eventuell nicht wie bisher vermutet stets an der Matrix sitzen, sondern nur zu Beginn der Replikation an die residuale Kernstruktur gebunden werden (92).

Es wurde vermutet, daß inverted repeats an der Bindung replizierender DNA an die Matrix beteiligt sein könnten (93). Bei der Untersuchung der matrixgebundenen DNA aus BALB/c3T3-Zellen, die an der G_1/S-Grenze synchronisiert worden waren, fand man eine Anreicherung von zwei spezifischen Arten von DNA-Sequenzen. Aufgrund dessen wurde ein Strukturvorschlag gemacht, in dem an der Matrix-Verankerungsstelle Palindrome mit zwei Loops beteiligt sind (94). Man nimmt an, daß bei Eukaryonten Palindrome am Aufbau von Replikations-Initiationsstrukturen beteiligt sind (95). Somit ist es nicht

erstaunlich, daß DNA-Abschnitte mit charakteristischen Sekundärstruktur-Möglichkeiten an der Matrix zu finden sind, wenn die Initiationstrukturen matrixgebunden sind. Eine analoge „atypische" Sekundärstruktur bei nicht in Replikation befindlicher DNA wurde bisher jedoch nicht gefunden.

3.1.3 DNA-Fragmentgrößenverteilung nach Bsp RI-Verdau ganzer Kerne

Eine wichtige Voraussetzung, um reproduzierbare Fragmentgrößenverteilungen zu erhalten, ist ein optimaler Verdau mit der Nuclease. Unter den in 2.2.8 angegebenen Bedingungen erhält man die optimale Enzymwirkung. In der Literatur sind auch andere Verdaubedingungen für Bsp RI angegeben worden (96). Allerdings wird hierbei die doppelte Verdauzeit benötigt, was sich allgemein bei Verwendung von Restriktionsenzymen als nachteiligt erweist (56). Eine Überprüfung des Anteils säureunlöslichen Materials unter den in dieser Arbeit verwendeten Verdaubedingungen (2.2.8) ergab, daß durch den Enzymverdau keine Oligonucleotide freigesetzt werden, was auf die Aktivität einer unspezifischen Nuclease schließen lassen würde.

Aus Abb. 3-5 ist ersichtlich, daß die Fragmentgrößenverteilungen von Kern-, Überstand- und Matrix-DNA deutlich voneinander unterscheidbar sind. Sowohl für die Fragmente replizierender DNA als auch für die der Gesamt- (in Replikationsruhe befindlicher) DNA gilt:
Größe Überstand-DNA-Fragmente < Größe Kern-DNA-Fragmente < Größe Matrix-DNA-Fragmente.
Errechnet man für die in Abb. 3-5 dargestellten Fragmente das mittlere auf die radioaktive Markierung bezogene Molekulargewicht unter Zuhilfenahme der Studier-Beziehung (97)

$s^{o}_{20,w} = 0{,}0882 \cdot M^{0{,}346}$ (M=Molekulargewicht, s=S-Wert)

nach der Formel

$$\overline{M}_{cpm} = \frac{\sum cpm_i \cdot M_i}{\sum cpm_i}$$

wobei $M_i = \left(\frac{(Fr-1)\cdot 1,57}{0,0882} \right) \frac{1}{0,346}$

und $(Fr-1)\cdot 1,57$ der Zusammenhang zwischen Fraktionsnummer Fr und S-Wert ist, so erhält man die in Tabelle 3 wiedergegebenen mittleren Molekulargewichte.

Tabelle 3
Mittlere Molekulargewichte relativ zur radioaktiven Markierung von den Fragmenten puls- und langzeitmarkierter DNA aus Kernen, Überstand und Matrix der Abb. 3-5.

	^{3}H-dThd-4 min-Pulsmarkierung	^{14}C-dThd-20 Std.-Langzeitmarkierung
Kerne	$6,25\cdot 10^6$ D	$6,95\cdot 10^6$ D
Überstand	$3,50\cdot 10^6$ D	$6,10\cdot 10^6$ D
Matrix	$15,19\cdot 10^6$ D	$25,00\cdot 10^6$ D

3.1.4 Anreicherung des Satelliten in der matrixgebundenen DNA

Augenfällig ist besonders der hochmolekulare Anteil langzeitmarkierter DNA-Fragmente in der Matrix (Abb. 5). Dieser Anteil kommt dadurch zustande, daß das Restriktionsenzym Bsp RI im Mäusesatelliten kaum schneidet. Man fand, daß das Isoschizomere Bsu RI nur 0,7 bis 1,5% der Satelliten-DNA schneidet, da die GGCC-Erkennungssequenz sehr selten in dieser hochrepetitiven DNA vorhanden ist (98).

Verdaut man Ehrlich-Ascites-Tumorzellkerne mit Bsp RI und trennt die Chromatinfragmente aufgrund ihrer Größe durch Gelfiltration, so findet man ebenfalls zwei Gipfel bei der Verteilung der DNA-Fragmentgrößen (96). In dem hochmolekularen Peak beträgt der Satellitanteil 65% der Gesamt-DNA (96). Benutzt man das Restriktionsenzym Eco RI zum Verdau von Kernen von L-Zellen der Maus, so erhält man ein ähnliches Profil wie in Abb. 5 (59). Die Bestimmung des $c_0t_{1/2}$-Wertes der einzelnen Gipfel ergibt, daß der Satellit im hochmolekularen Anteil enthalten ist. Der Mäusesatellit ist auch für das Enzym Eco RI aufgrund der geringen Anzahl Schnittstellen wenig zugänglich (99).

Um zu überprüfen, ob durch Verwendung von Bsp RI tatsächlich der Satellit an der Kernmatrix angereichert ist, wurde ein in der Literatur bisher noch nicht gewählter Weg gewählt, nämlich eine Ag^+/Cs_2SO_4-isopyknische Zentrifugation der Matrix-DNA. Das Ergebnis dieser Untersuchung findet sich in Abb. 6-11. In Abb. 6-8 sind die Profile der isopyknischen Läufe in Cs_2SO_4 wiedergegeben. Es ist jeweils nur ein einziger Peak erkennbar, der die Hauptbanden- und Satellit-DNA enthält. Bei der Matrix-DNA (Abb. 8) ist ein erhöhter Untergrund an Radioaktivität außerhalb des Peaks zu beobachten, was vermutlich auf Radiolyse der DNA zurückzuführen ist. Bei Markierung mit ^{3}H-dThd (vgl. Abb. 53) tritt ein solcher Untergrund nicht auf.

In den Abb. 9-11 sind die Profile unter gleichzeitiger Anwesenheit von Ag^+ zur Erhöhung der Dichteunterschiede wiedergegeben. In dem leicht alkalischen Gradienten (pH > 9) ist die Dichte GC-reicher Ag^+/DNA-Komplexe größer als die AT-reicher (100). Darauf beruht die Möglichkeit, den AT-reichen Mäusesatelliten abzutrennen (77, 101-103). Aus Abb. 9-11 wird erkennbar, wie der Satellit in der Überstand-DNA im Vergleich zur Kern-DNA unterrepräsentiert ist, in der Matrix-DNA dagegen überrepräsentiert. Um diese Ergebnisse zu quantifizieren, kann man analog zu (60) verfahren und die Flächen unter der Kurve zueinander in Beziehung setzen. Danach machen die Hauptbanden (Gipfel im höheren Dichtebereich) bei Kern-DNA 71%, bei Überstand-DNA 86% und bei Matrix-DNA 44% der jeweiligen DNAs aus.

Abb. 6-8: Isopyknische Zentrifugation von ^{32}P-markierter Kern-, Überstand- und Matrix-DNA im Cs_2SO_4-Gradienten. Die Proben in 10 mM Borat pH 9,2 werden bis zu einem Gewicht von 7,50 g versetzt und mit 5,71 g Cs_2SO_4 versetzt. Zentrifugationsbedingungen: 50 Ti-Rotor, 45 000 rpm, 25°C, 72 Std. —— = ^{32}P-DNA; •—— = Dichte

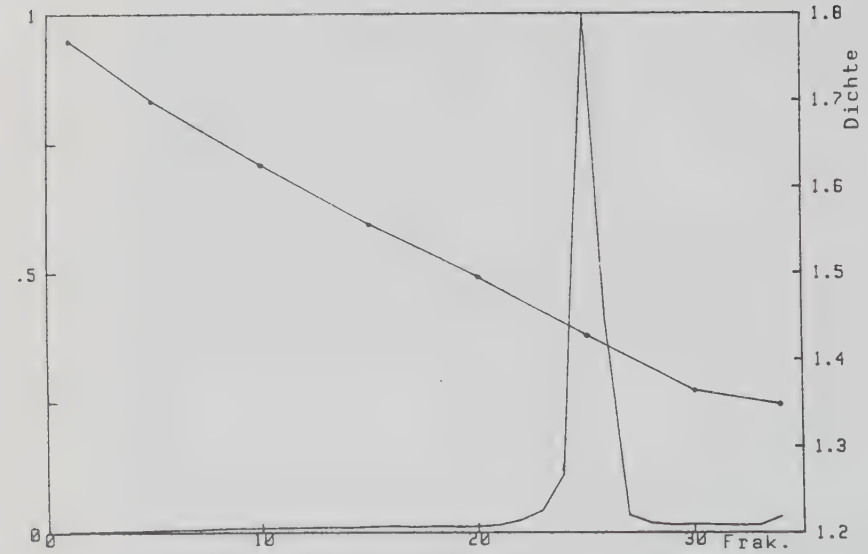

Abb. 6: Kern-DNA. cpm im Maximum: 40 129

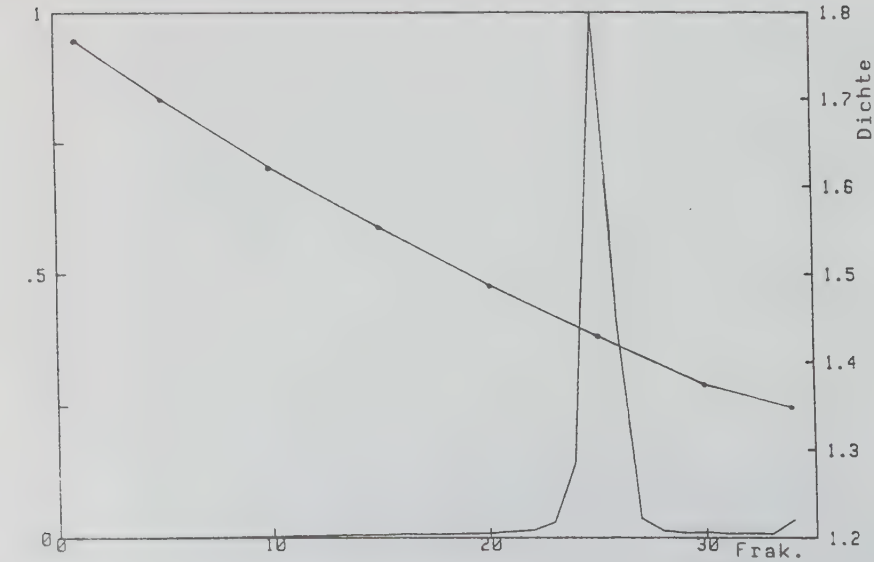

Abb. 7: Überstand-DNA. cpm im Maximum: 58 609

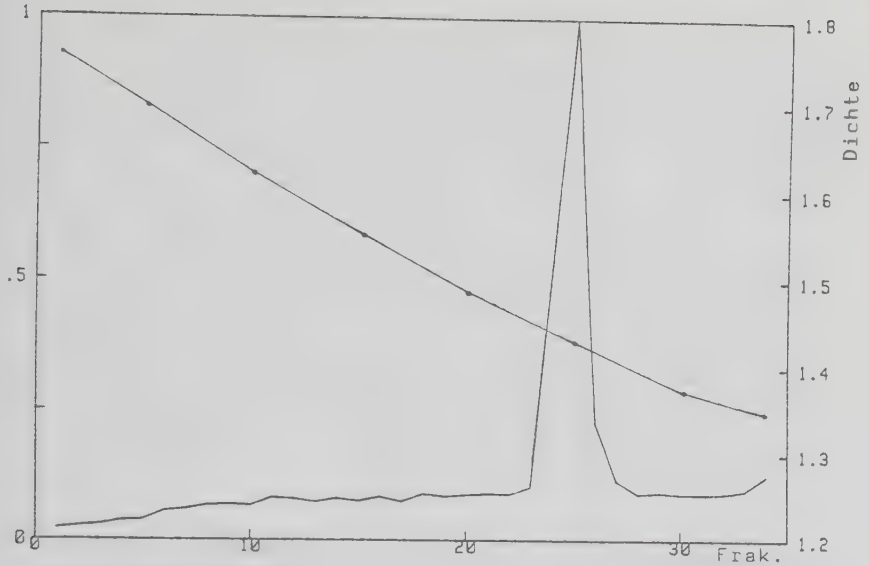

Abb. 8: Matrix-DNA. cpm im Maximum: 36 648

Abb. 9-11: Isopyknische Zentrifugation von ^{32}P-markierter Kern-, Überstand- und Matrix-DNA im Ag^+/Cs_2SO_4-Gradienten. Gleiche Bedingungen wie bei Abb. 6-8, zusätzlich $AgClO_4$ bis zu einem Ag^+/DNA-Phosphat-Verhältnis von 0,27.
——— = ^{32}P-DNA; •——• = Dichte

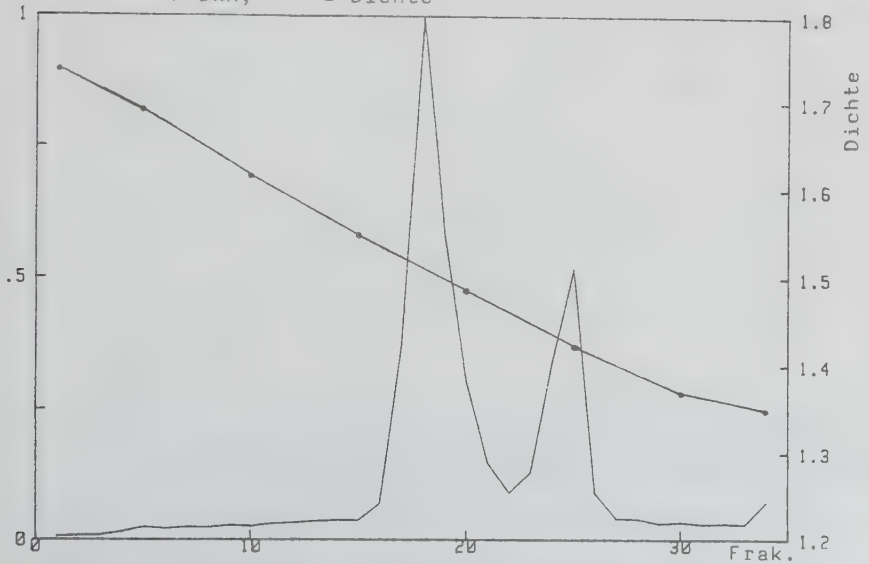

Abb. 9: Kern-DNA. cpm im Maximum: 13 705

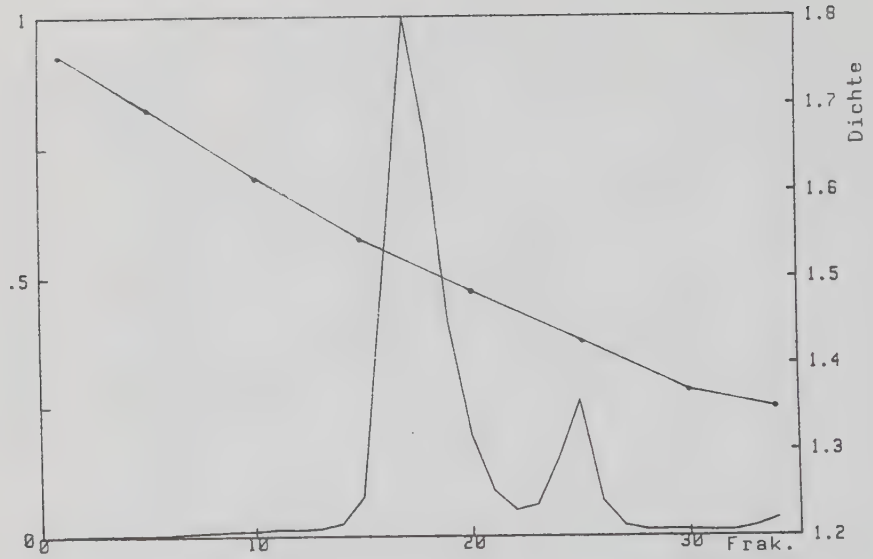

Abb. 10: Überstand-DNA. cpm im Maximum: 54491

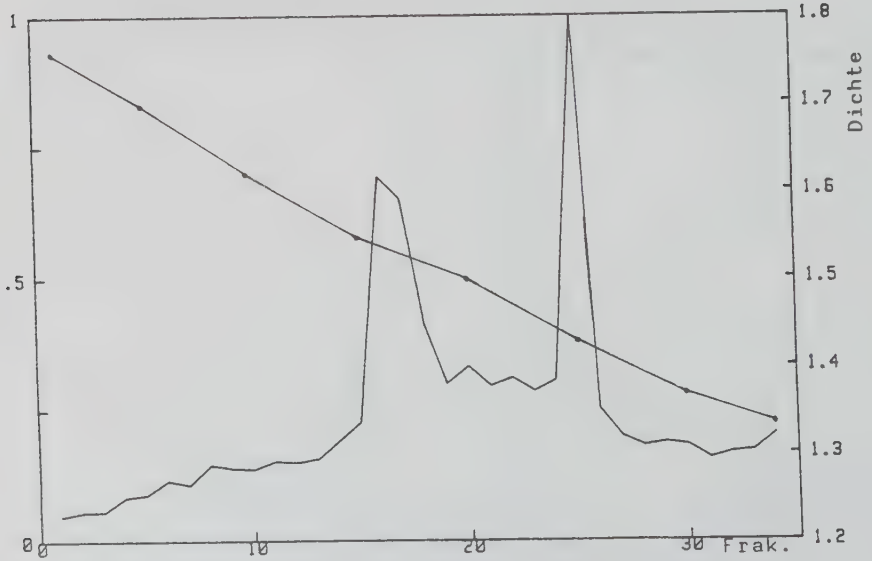

Abb. 11: Matrix-DNA. cpm im Maximum: 19 142

3.1.5 Einfluß unvollständiger Matrix-Auflösung auf die Sedimentationsprofile der matrixassoziierten Fragmente

Um die Größe der DNA-Fragmente, die an der Kernmatrix lokalisiert sind, durch Gradienten-Zentrifugation ckarakterisieren zu können, muß die Kernmatrix lysiert werden. Dadurch werden die DNA-Fragmente freigesetzt. Erfolgt die Matrixauflösung nicht vollständig, so werden falsche Fragmentgrößen vorgetäuscht. Die noch an die Matrix gebundenen DNA-Stücke pelletieren aufgrund des hohes Molekulargewichts der Matrix bis zum Röhrchenboden und entziehen sich der Bestimmmung. Außerdem ist bei einer unvollständigen Matrix-Auflösung nicht gewährleistet, daß reproduzierbare Sedimentationsprofile erhalten werden.

Die Graphen der Abb. 3-5 wurden bei vollständig aufgelöseter Kernmatrix ermittelt. Erfolgt die Lyse der Matrix in 0,2 mM EDTA, 0,1% Sarcosyl, pH 7,8 bei 4°C, so erhält man die Kurven aus Abb. 12-15. Dargestellt sind die Molekulargewichtsverteilungen der Fragmente, die aus Kernen bzw. den Pellets der Kernmatrix-Isolierungsstufen 1 (0,2 mM Puffer-Behandlung), 2 (2 M NaCl-Behandlung) und 3 (Triton X-100-Behandlung) freigesetzt wurden. Die Isolierungsstufe 3, d.h. die Behandlung mit dem nichtionischen Detergens Triton X-100 (1%ig) wird analog (9) durchgeführt.

Bei der Lyse mit 0,2 mM EDTA, 0,1% Sarcosyl, pH 7,8 werden nur die Fragmente mit kleinem Molekulargewicht freigesetzt. Die Satellitanreicherung an der Matrix mit fortschreitender Matrixisolierungs-Prozedur wird nicht erkannt, da sich die hochmolekularen (satellitenthaltenden) DNA-Anteile dem Nachweis entziehen.

Abb. 12-15: Sedimentation von Kern-DNA sowie von der DNA aus den Matrixisolierungsschritten 1-3 im selben Gradienten und unter denselben Bedingungen wie in Abb. 3-5 mit Ausnahme einer Zentrifugationsdauer von 5 Std. 40 min (1 Fraktion entspricht 1,1 S statt 1,7 S) nach Matrix-Auflösung in 0,2 mM EDTA, 0,1% Sarcosyl, pH 7,8 (4°C). Der Pfeil markiert die Lage von λplac5-DNA.
——— = ^{3}H-DNA (1 min-Puls); ——— = ^{14}C-Markierung (20 Std.)

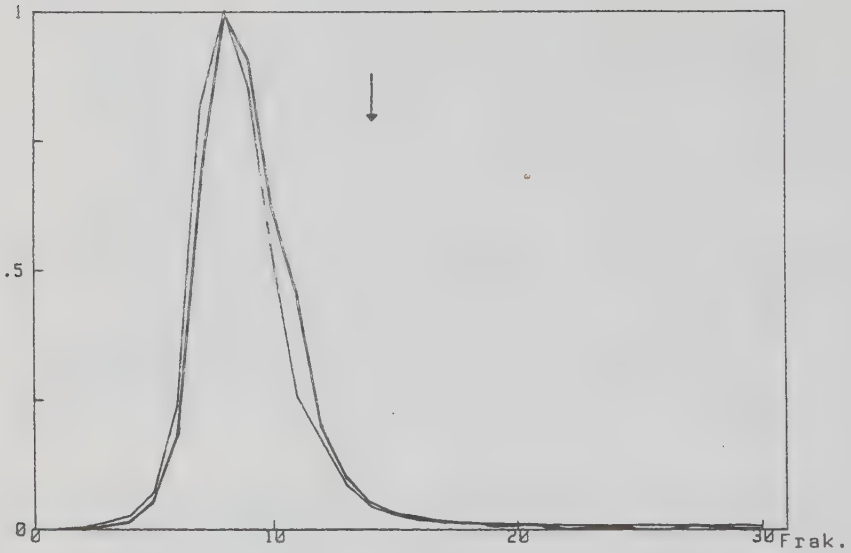

Abb. 12: Kern-DNA. cpm im Maximum: ^{3}H = 2729; ^{14}C = 8934

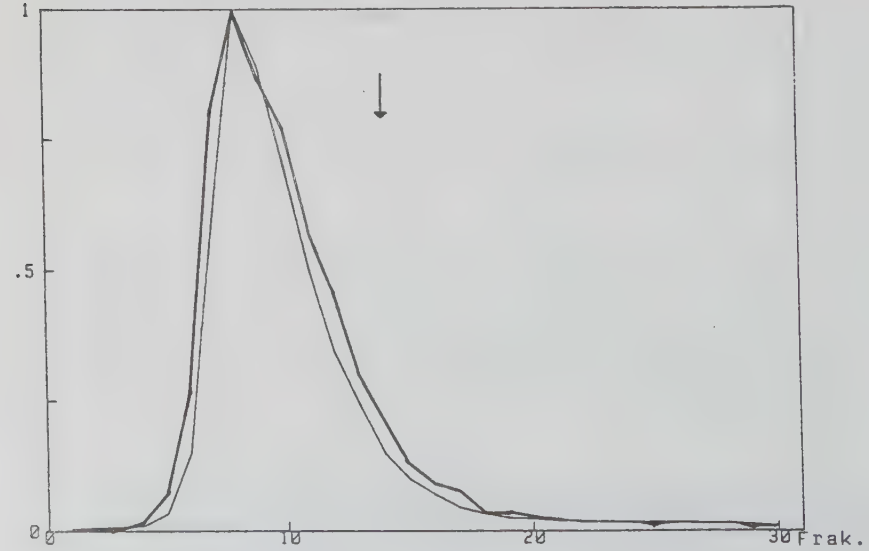

Abb. 13: Step 1-DNA. cpm im Maximum: ^{3}H = 1483; ^{14}C = 6028

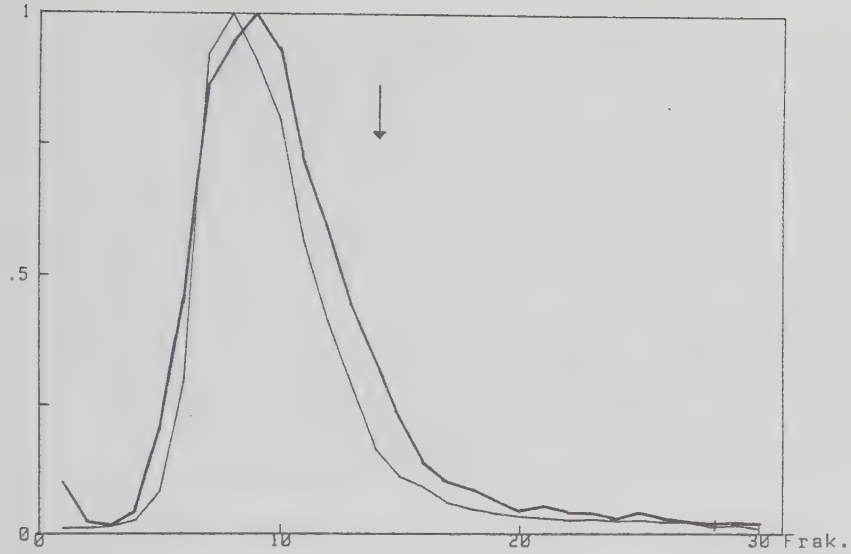

Abb. 14: Step 2-DNA. cpm im Maximum: ^{3}H = 1740; ^{14}C = 4217

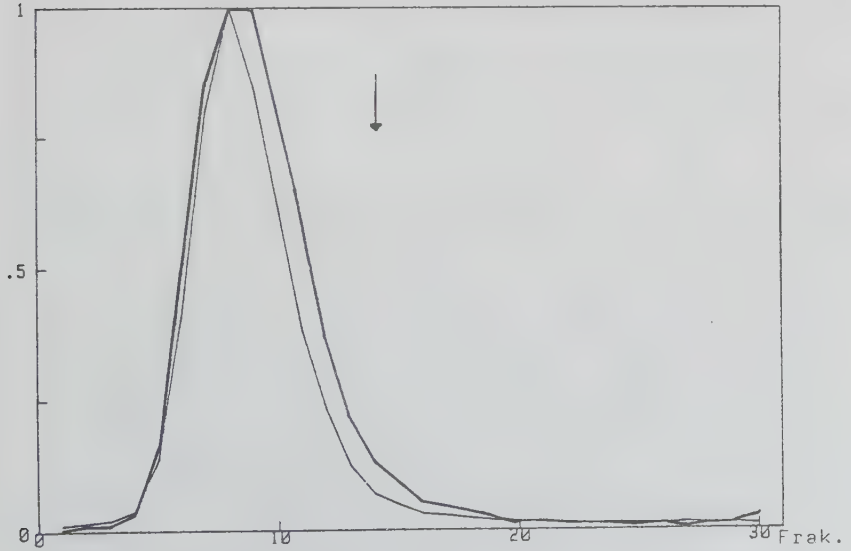

Abb. 15: Step 3-DNA. cpm im Maximum: ^{3}H = 1483; ^{14}C = 4059

Eine wesentliche Verbesserung der Matrixlyse erhält man, wenn die Matrix vor der Lyse in einem Dounce-Homogenisator mit Glaskugelstempel ca. 10mal homogenisiert wird. Die dann erhaltenen Fragmente sollten die tatsächliche Molekulargewichtsverteilung widerspiegeln, denn λ-Bsp RI-Fragmente sind unter den gleichen Bedingungen nicht scherempfindlich (hier nicht abgebildet). Daher sollten die Matrix-DNA-Bsp RI-Fragmente auch nicht scherempfindlich sein. Es wird dabei jedoch außer acht gelassen, daß der hochmolekulare Matrix-DNA-Anteil sehr wohl unter diesen Bedingungen geschert wird, wodurch ein zu kleines Molekulargewicht vorgetäuscht wird (hier nicht abgebildet). Deshalb wurde bei allen in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen nach der in „Material und Methoden" angegebenen Vorgehensweise verfahren.

Von entscheidender Bedeutung bei der Durchführung des Proteinase K-Verdaus zur Entfernung der Mehrzahl der Matrix-Proteine ist eine vollständige Entfernung des Proteinase-Inhibitors PMSF, der in den Matrix-Isolierungspuffern enthalten ist. Die Qualität der Matrixauflösung hängt stark von der PMSF-Abwesenheit ab. PMSF ist ebenso wie Natriumtetrathionat in den Isolierungspuffern notwendig, um eine möglichst intakte Kernmatrix zu erhalten (104-105).

Wird durch Wahl der richtigen Bedingungen die tatsächliche DNA-Fragmentgrößenverteilung erhalten (Abb. 3-5), so fällt auf (sieht man von dem hochmolekularen Satellitanteil ab), daß die matrixgebundenen Fragmente größer als die Überstand-Fragmente sind. Da gebundene Fragmente einen ausgezeichneten Punkt, die Matrix-Bindungsstelle enthalten, der in den freigesetzten Fragmenten fehlt, ist aus Gründen der Fragmentierungs-Statistik (106) bei den gebundenen Fragmenten eine größere Kettenlänge zu erwarten. Berezney und Buchholtz (19) erhielten nach Verdau von Rattenleber-Zellkernen mit endogenen Nucleasen matrixgebundene Fragmente von 1,6 kb, welche ebenfalls größer sind als die 0,8 kb großen Fragmente der Gesamt-DNA.

3.1.6 DNA-Freisetzung während der Matrixisolierung

Die Freisetzung von DNA-Fragmenten aus Kernen während der Isolierung der Kernmatrix erfolgt mittels zweier Puffer. Der erste enthält 0,2 mM $MgCl_2$, der zweite 2 M NaCl. Durch die Anwendung des hypotonen Puffers kommt es zum Schwellen und zur Lyse der Kerne, während im 2 M Puffer das Chromatin dissoziiert wird. Allerdings werden nicht alle Histone entfernt, wenn die Matrix-Isolierungspuffer Natriumtetrathionat enthalten, so daß in der Kernmatrix noch Histone vorhanden sind (8, 9). Es ist ein gewisser Hinweis auf den Einfluß ionischer Wechselwirkungen bei der Anheftung des Chromatins an die Kernmatrix zu erhalten, wenn man den Anteil der DNA berechnet, der sich nach Behandlung mit 2 M NaCl von der Kernmatrix trennt (Tabelle 4).

Tabelle 4
Anteil der DNA, der nach Behandlung mit hypotonem Puffer (0,2 mM $MgCl_2$) mittels 2 M NaCl-Puffer von der Matrix abtrennbar ist. Mittelwerte und Standardabweichungen aus sechs Versuchen.

	^{3}H-dThd-2 min-Pulsmarkierung	^{14}C-dThd-20 Std.-Langzeitmarkierung
% der 2 M NaCl-Puffer-löslichen DNA*	58,2 ± 3,7 (n = 6)	78,5 ± 5,6 (n = 6)

*100% sind die vor der Behandlung mit 2 M Puffer vorhandene Gesamtmenge an DNA

Aus Tabelle 4 geht hervor, daß ein größerer Anteil der langzeitmarkierten (in Replikationsruhe befindlichen) DNA als der pulsmarkierten DNA erst durch den 2 M Puffer von der residualen Kernstruktur abgelöst werden kann. Daher kann man die Schlußfolgerung ziehen, daß bei der noch verbleibenden DNA hydrophobe Wechselwirkungen (beispielsweise über Einzelstrang-DNA-Bereiche) oder kovalente Bindungen an Matrix-Proteine bei replizierender DNA einen größeren Anteil der Wechselwirkungen mit der Kernmatrix ausmachen als bei der nichtreplizierenden DNA. Dessenungeachtet ist diese Art Wechsel-

wirkungen bei der in Replikationsruhe befindlichen DNA ebenfalls vorhanden, denn sonst würden durch den 2 M NaCl-Puffer theoretisch 100% der noch verbleibenden DNA solubilisiert werden.

Berezney und Coffey untersuchten die Verteilung der replizierenden DNA auf die 0,2 mM $MgCl_2$-, die 2 M NaCl- und die Kernmatrix-Fraktionen (11). Aufgrund unterschiedlich langer Pulse fanden sie heraus, daß die Replikation an der Kernmatrix stattfindet, wobei bei sehr kurzen Pulsen der größte Teil der radioaktiven Markierung in der DNA zu finden ist, die an der Kernmatrix hängt. Wird der Puls für eine längere Zeit durchgeführt, so nimmt der Anteil der Markierung an der Kernmatrix ab und in der 2 M NaCl-Fraktion zu. Schließlich verschwindet auch hier der hohe prozentuale Anteil der Markierung, falls noch längere Pulse durchgeführt werden. Daraus schlossen Berezney und Coffey, daß eine zeitliche Abfolge von DNA-Synthese und -Transport im Zellkern stattfindet (11): residuale Matrix-DNA ⟶ 2 M Salz-lösliche DNA ⟶ hypotoner Puffer-lösliche DNA. Einen weiteren Anhaltspunkt für das Vorhandensein eines in vivo-Transportmechanismus liefern elektronenmikroskopische Autoradiographie-Untersuchungen (107, 108). Hierbei erscheint neu replizierte DNA zunächst in der Interchromatin-Matrix und entlang der Grenzen des kondensierten Chromatins; nach einem langen Chase findet man die Silberkörner zunehmend im Inneren der Heterochromatinbereiche.

Das Loop-Modell der DNA-Replikation (16, 17, 19, 109) erklärt zum Teil das Erscheinen der radioaktiven Markierung in den unterschiedlichen Fraktionen. Danach wird die DNA zunächst an den Loop-Verankerungsstellen repliziert und wandert dann entlang des Loops in immer größere Entfernung von der ursprünglichen Verankerungsstelle.

Über die Beschaffenheit der DNA, insbesondere der nicht replizierenden, an der Matrix-Verankerungsstelle ist wenig be-

kannt. Daher sollte weiter untersucht werden, wie die ca. 20% nicht 2 M NaCl-lösliche DNA aus Tabelle 4 an der Verankerungsstelle aussieht und ob Einzelstrangbereiche zu finden sind. Die Ergebnisse finden sich unter 3.2 und 3.3.

3.2 Untersuchung der matrixgebundenen DNA auf Einzelstrangbereiche

3.2.1 Allgemeines

Die Kernmatrix stellt eine hydrophobe residuale Struktur dar (7). Daher kann man annehmen, daß DNA über Einzelstrang- und nicht über Doppelstrangbereiche mit der Kernmatrix verbunden ist, da hydrophobe Wechselwirkungen bevorzugt mit Einzelsträngen erreicht werden. Um zu überprüfen, wie die Affinität der Kernmatrix für Einzel- und Doppelstrang-DNA ist, wurden von Comings und Wallack in vitro-Rekonstitutionsexperimente durchgeführt (110). Sie untersuchten die Bindungsfähigkeit von Matrixproteinen für doppel- und einzelsträngige DNA und fanden, daß Einzelstrang-DNA bevorzugt gebunden wird. Dabei spielt es keine Rolle, ob homologe (Maus-) oder heterologe (E. coli-) DNA eingesetzt wird, man erzielt stets das gleiche Ergebnis. AT-reiche Doppelstrang-DNA bindet effektiver an die Matrix als GC-reiche Doppelstrang-DNA, während Einzelstrang-DNA besser als AT-reiche Doppelstrang-DNA bindet. Die effektivste Bindung erzielt man mit poly(dT). Comings und Wallack untersuchten auch, ob die Matrixproteine ähnlich wie das T4-Gen 32-Protein (111) in der Lage sind, die DNA zu denaturieren und somit künstliche Einzelstrangbereiche zu schaffen. Sie fanden, daß keine Denaturierung der DNA auftritt, sondern eine DNA-Aggregation durch die Matrixproteine (110).

Ist matrixgebundene DNA über Einzelstrangbereiche an die residuale Kernstruktur gebunden, so sollten sie mittels Hydroxyapatit-Chromatographie und isopyknische CsCl- oder Cs_2SO_4-

Zentrifugation (112-114) nachweisbar sein, falls der Einzelstranganteil groß genug ist. Bei einem sehr geringen Anteil wurde von Probst et al. mittels Nitrocellulose-Bindung eine Methode entwickelt, die Aufschluß über die Existenz relativ kleiner Einzelstrangbereiche gibt (80, 115-119).

3.2.2 Untersuchung auf Einzelstrangbereiche mittels isopyknischer Zentrifugation

Bei der isopyknischen Zentrifugation reichert sich eine DNA-Probe an der Stelle des Gradienten an, die ihrer Schwimmdichte entspricht. Diese nimmt entsprechend dem Anteil der GC-Basenpaare zu und hat bei 50% GC-Gehalt in CsCl einen Wert von ca. 1,700. Einzelstrang-DNA weist eine um 0,015 g/cm^3 höhere Dichte auf als Doppelstrang-DNA mit derselben Basenzusammensetzung. Daher ist einzelsträngige DNA von doppelsträngiger DNA im isopyknischen Gradienten unterscheidbar. In Abb. 6-8 und 16-18 sind die isopyknischen Läufe von Kern-, Überstand- und Matrix-DNA im Cs_2SO_4- bzw. CsCl-Gradienten dargestellt.

Aufgrund der Ergebnisse kann nicht geschlossen werden, daß Einzelstrang-DNA am Aufbau der Matrix-DNA beteiligt ist. Es sieht vielmehr danach aus, als ob ausschließlich doppelsträngige DNA in der Matrix-DNA vorhanden ist. Die Empfindlichkeit der Methode für kleine Einzelstranganteile ist zumindest zu gering, um ausschließlich mit Hilfe der isopyknischen Zentrifugation einen Hinweis auf Einzelstrang-DNA zu finden.

Da die Matrix-DNA genauso wie die Überstand- und Kern-DNA demnach ganz überwiegend aus Doppelsträngen zu bestehen scheint, kann man aus der Schwimmdichte den mittleren GC-Gehalt der DNA nach der Beziehung ermitteln (120):

$$\text{Mol\% G+C} = \frac{\rho - 1{,}660}{0{,}00098}$$

Setzt man die aus Abb. 16-18 ermittelte Dichte von 1,701 ein, so erhält man ein Ergebnis von 41,84% G+C, was mit den

Abb. 16-18: Isopyknische Zentrifugation von Kern-, Überstand- und Matrix-DNA im CsCl-Gradienten. Die Zentrifugation erfolgt in einer CsCl-Lösung in 0,1·SSC einer Dichte von 1,700 g/cm^3. Zentrifugationsbedingungen: 50 Ti-Rotor, 40 000 rpm, 20°C, 72 Std. Fraktionsgröße: 0,2 ml.
——— = ^{3}H-DNA (2 min-Puls); ——— = ^{14}C-DNA (20 Std.-Markierung); •——• = Dichte

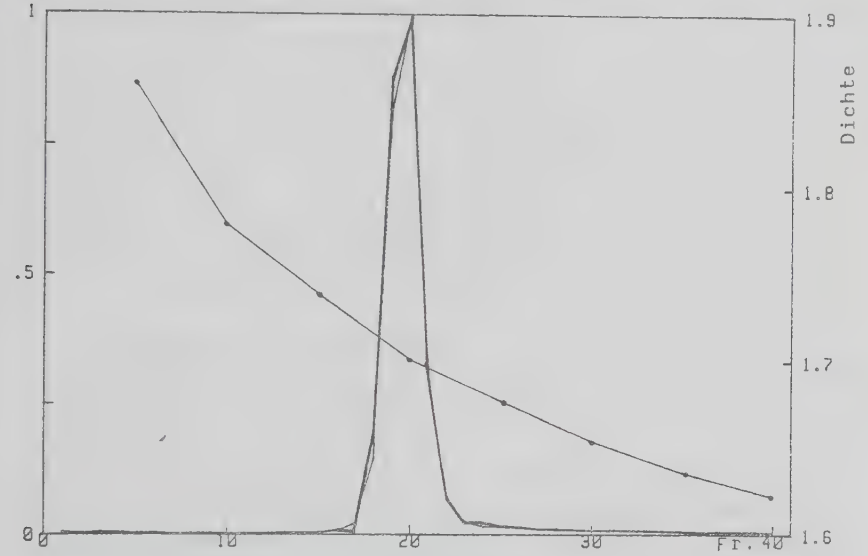

Abb. 16: Kern-DNA. cpm im Maximum: ^{3}H = 26 341, ^{14}C = 4 275

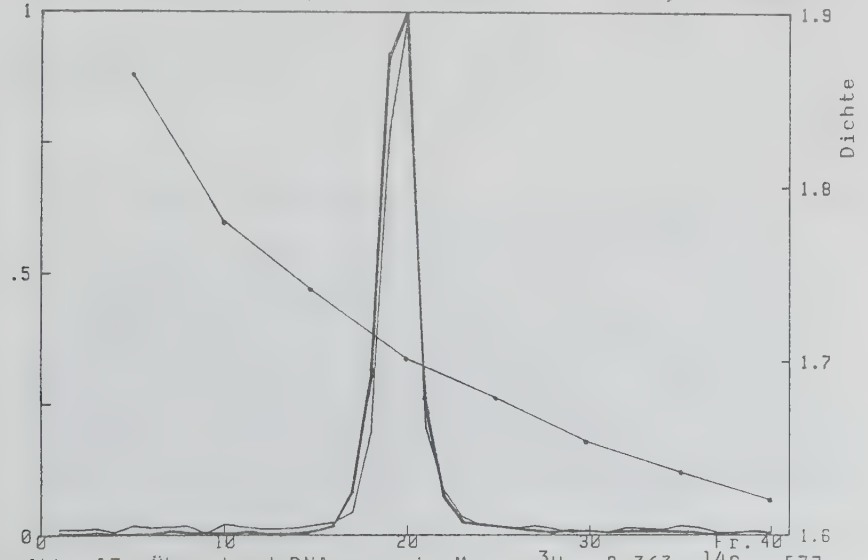

Abb. 17: Überstand-DNA. cpm im Max.: ^{3}H = 2 363, ^{14}C = 577

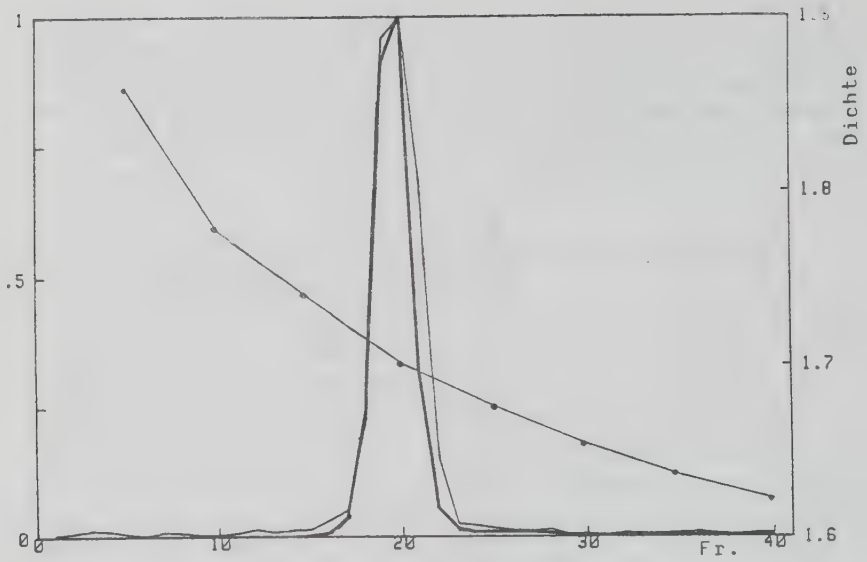

Abb. 18: Matrix-DNA. cpm im Maximum: ^{3}H = 7 022, ^{14}C = 558

in der Literatur angegebenen Daten von 40,5-42% G+C für Maus-DNA sehr gut übereinstimmt. Diese Basenzusammensetzung, die 21% G, 21% C, 29% A und 29% T entspricht, wenn man die Chargaff-Regeln anwendet, trifft sowohl für Kern- als auch für Überstand- und Matrix-DNA zu, und zwar jeweils sowohl für die pulsmarkierte als auch für die langzeitmarkierte DNA. Aufgrund dessen muß man davon ausgehen, daß die Basenzusammensetzung in Überstand- und Matrix-DNA gleich ist.

3.2.3 Untersuchung auf Einzelstrangbereiche mittels Hydroxyapatit-Chromatographie

Hydroxyapatit kann zur Fraktionierung von DNA sowie zur Trennung von Einzelstrang- und Doppelstrang-DNA verwendet werden, wobei Einzelstrang-DNA bei einer niedrigeren Phosphatkonzentration als doppelsträngige DNA eluiert wird (121 - 123). Daher wurde auch mittels Hydroxyapatit-Chromatographie untersucht, ob Anhaltspunkte für die Existenz von Einzelstrang-DNA-Bereichen in der Matrix-DNA vorhanden sind. Kern-,

Überstand- und Matrix-DNA sowie eine nach 2.2.12 isolierte Maus-DNA wurden auf jeweils eine Hydroxyapatit-Säule aufgetragen und mit einem linearen 0,05-0,4 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0 eluiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 19-22 dargestellt. Es gibt keinen eindeutigen Hinweis auf das Vorhandensein größerer Einzelstrangbereiche. Bei der vergrößerten Darstellung des Einzelstrangbereiches (hier nicht abgebildet) erkennt man einen verstärkten Anteil der pulsmarkierten Matrix-DNA im Vergleich zur pulsmarkierten Überstand-DNA. Bei der langzeitmarkierten DNA sind jedoch keine signifikanten Unterschiede zu erkennen, so daß die Hydroxyapatit-Chromatographie keinen Anhaltspunkt für die Existenz von Einzelstrangbereichen in der Kernmatrix-DNA bietet.

Werden DNA-Doppelstränge mit Exonuclease III verdaut, so daß teilweise endständige Einzelstrang-Moleküle entstehen, so werden diese Moleküle nicht bei einer Molarität eluiert, die dem Einzelstrang entspricht, sondern einem Doppelstrang-Molekül einer um den Einzelstranganteil verminderten Länge (124). Somit bleiben die einzelsträngigen Bereiche maskiert. Die Anwesenheit von ca. 30 Basenpaaren in einem ansonsten einzelsträngigen Molekül reicht aus, um das gesamte Molekül wie Doppelstrang-DNA an Hydroxyapatit zu binden (124).

Daß Matrix-DNA bei einer höheren Phosphatmolarität als Kern- oder Überstand-DNA eluiert wird, ist teilweise damit zu erklären, daß die DNA-Länge in der Reihenfolge Überstand < Kern < Matrix zunimmt (vgl. Tabelle 3). In der Literatur wurde beschrieben, daß die DNA-Länge einen Einfluß auf die Elutionsmolarität ausübt (121, 124). Allerdings findet man, daß DNA-Doppelstränge mit Molekulargewichten von $1 \cdot 10^5$ bis $6 \cdot 10^6$ (deren Größe sich also um einen Faktor von 60 unterscheidet) alle bei einer Molarität von 0,20 bis 0,22 eluiert werden (121). Daher muß man annehmen, daß die in Abb. 19-21 dargestellten Unterschiede in der Elutionsmolarität vermut-

Abb. 19-22: Hydroxyapatit-Säulenchromatographie von Kern-, Überstand-, Matrix- und einer alkalisch denaturierten Referenz-DNA. Säulenvolumen: 2 ml; Säulendurchmesser: 9 mm. Elutionspuffer. 0,05-0,4 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0; Fraktionsgröße: 0,8 ml.
——— = ^{3}H-DNA (4 min-Puls); ——— = ^{14}C-DNA (20 Std.-Markierung); •——• = Phosphat-Konzentration in Mol/l

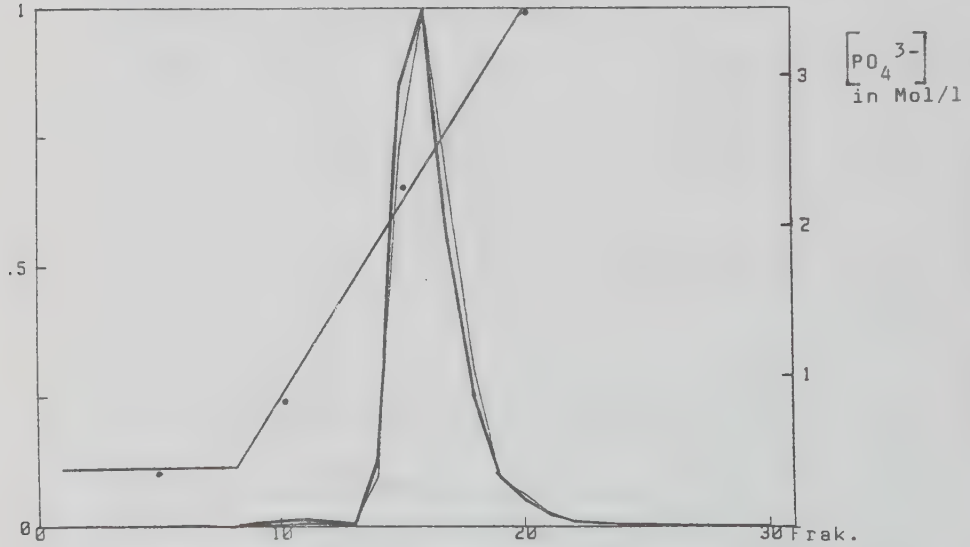

Abb. 19: Kern-DNA. cpm im Maximum: ^{3}H = 23 147, ^{14}C = 12 006

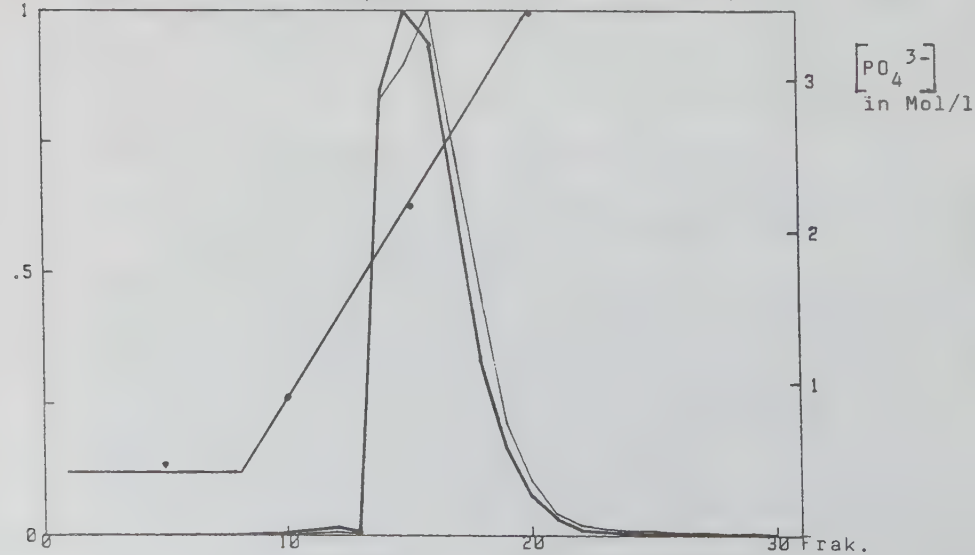

Abb. 20: Überstand-DNA. cpm im Max.: ^{3}H = 17 775, ^{14}C = 7 222

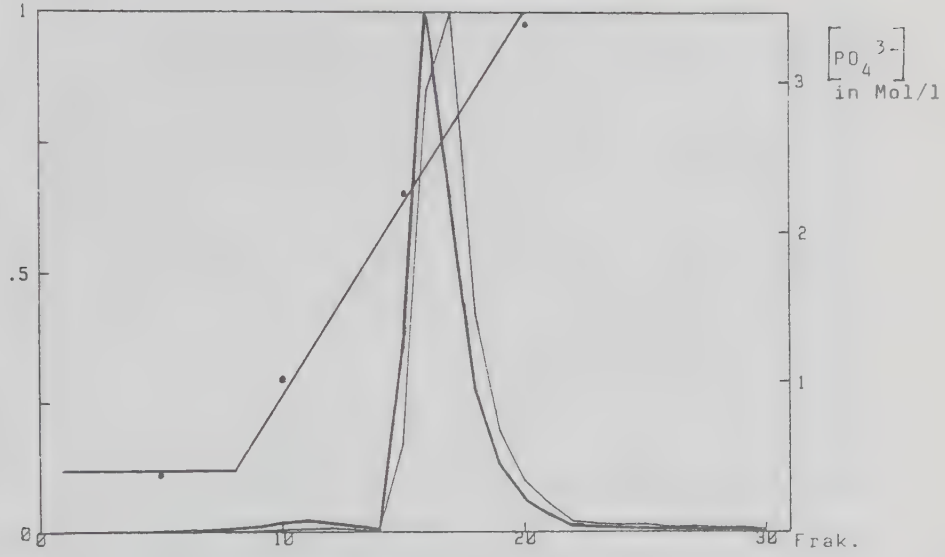

Abb. 21: Matrix-DNA. cpm im Maximum: ^3H = 74 794, ^{14}C = 3 196

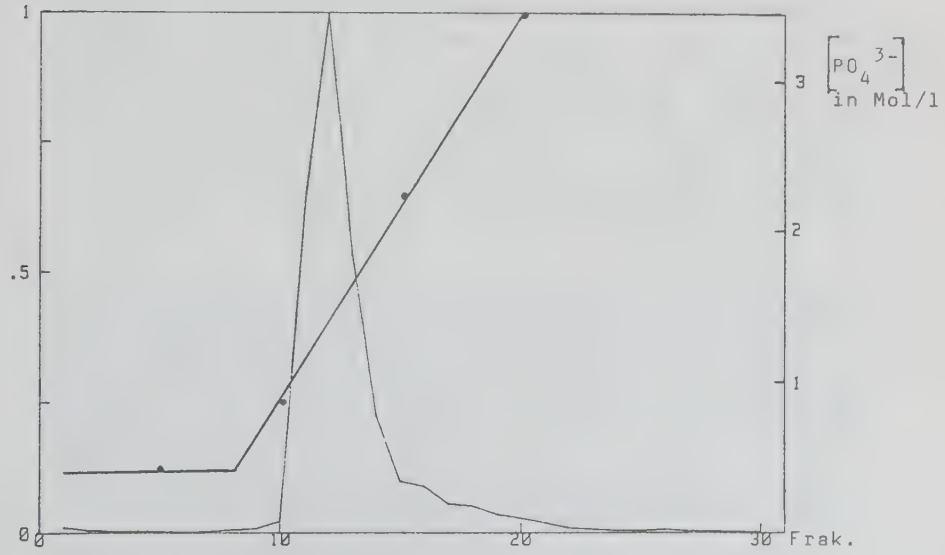

Abb. 22: Denaturierte Referenz-DNA (^3H-dThd-langzeitmarkiert). cpm im Maximum: 7 680

lich zumindest teilweise eine weitere Ursache haben. Es ist durchaus vorstellbar, daß Matrix-DNA sehr fest an Phosphoproteine gebunden ist. Die Eigelb-Phosphoproteine ß-Lipovitellin, α-Lipovitellin und Phosphovitin werden von Hydroxyapatit erst bei Phosphatmolaritäten von 0,4 bzw. 0,75 bzw. 1,2 eluiert (125). Bei Phosphovitin machen die Phosphorylserine nahezu 50% aller Aminosäuren aus. Ob in der Kernmatrix Phosphoproteine vorhanden sind wurde bereits vor längerer Zeit untersucht, denn man nahm an, daß sie in der Kernmatrix an der Regulation der Kernfunktionen beteiligt sind, z.B. bei der DNA-Synthese.

Um diese Möglichkeit zu testen, wurde von Allen et al. (126) untersucht, inwieweit eine Modifikation der Kernmatrixproteine durch Phosphorylierung auftritt. Sie fanden an einem in vitro-System aus isolierten Zellkernen und γ-^{32}P-ATP eine 2-3fach höhere Phosphorylierung von Matrixproteinen im Vergleich zu Gesamtproteinen aus Zellkernen. Diese Phosphorylierung von Matrixproteinen wurde darüber hinaus 3fach erhöht, wenn regenerierende Leber kurz vor Beginn der DNA-Synthese untersucht wurde. Ferner fanden Agutter und Birchall (46) heraus, daß die Nucleosidtriphosphatase des Kernporen-Lamina-Komplexes (eines Bestandteiles der Kernmatrix) die γ-^{32}P-ATP-abhängige Phosphorylierung eines Polypeptides katalysiert, welches vermutlich Bestandteil der Kernmatrix ist.

Matrixproteine werden durch spezifische Proteinkinasen phosphoryliert (47). Diese sind in der Kernmatrix lokalisiert. Ferner wurden acht bis zehn Phosphoproteine im Molekulargewichtsbereich 76 000 bis 260 000 D isoliert (127). Aufgrund dessen wird vorgeschlagen, daß zumindest einige dieser Phosphoproteine fest mit der Matrix-DNA verbunden sein könnten und somit die erhöhte Elutionsmolarität bewirken.

3.2.4 Untersuchung auf Einzelstrangbereiche mittels Nitrocellulosebindung

Nachdem mittels isopyknischer Zentrifugation (3.2.2) und Hydroxyapatit-Chromatographie (3.2.3) festgestellt worden war, daß keine großen Einzelstrangbereiche in der Matrix-DNA vorhanden sind, wurde mittels der Bindung an Nitrocellulose auf sehr kleine Einzelstranganteile getestet. Dazu wurde eine Methode angewandt, die erstmals von Probst (117) eingeführt worden war und die sich der Bindung von Einzelsträngen an Nitrocellulose und der Verhinderung dieser Bindung nach vorherigem Verdau der DNA mit einzelstrangspezifischer Nuclease bedient. Probst fand heraus, daß durch Ultraschall-Fragmentierung eine günstigere Bindung an Nitrocellulose erreichbar ist, weil ein Großteil des übrigen rein doppelsträngigen Molekülanteils abgetrennt wird. Allerdings wies Probst auch auf die Gefahr der Verwendung von Ultraschallbehandlung helikaler DNA hin: es wird auch ein kleiner Anteil von Fragmenten mit gewissem Einzelstrang-Charakter erzeugt (117). Eine DNA-Fragmentierung, welche keine künstlichen Einzelstrangbereiche bildet, ist die Kryolyse nach Lyskov und Moshkovsky (78). Hier wurde diese Fragmentierung nötig, weil die Bsp RI-Fragmente von Matrix-DNA wesentlich größer sind als die von Überstand-DNA (vgl. Tabelle 3). Erst bei vergleichbarer Fragmentgröße läßt sich die Anzahl von Einzelstrangbereichen einigermaßen quantifizieren. Besitzen beispielsweise zwei gleichförmig markierte Moleküle jeweils eine Nitrocellulose-Bindungsstelle und hat eines der beiden Moleküle eine 10fach so große Länge, so wird mit letzterem über die eine Bindungsstelle 10mal so viel Radioaktivität gebunden. Erst nach Normierung auf gleiche Länge erkennt man, daß keine vermehrte Bindung im Vergleich zum anderen Molekül auftritt.

Die Untersuchung der Nitrocellulosebindung nach vorherigem Verdau mit einzelstrangspezifischer Nuclease ist von besonderer Bedeutung. Wie aus der Literatur hervorgeht können Proteine unter den gleichen Bedingungen wie einzelsträngige

DNA an Nitrocellulose binden (81, 128, 129). Somit können Proteine als Bindungsvermittler zwischen doppelsträngiger DNA und Nitrocellulose fungieren und eine Bindung der DNA verursachen, die unter den gewählten ionischen Bedingungen bei Abwesenheit der Proteine nicht aufgetreten wäre. Die Adenovirus-DNA enthält ein terminales Protein, welches kovalent an die DNA gebunden ist und somit die Bindung dieser an Nitrocellulose vermittelt (130, 131). Wird mit einer einzelstrangspezifischen Nuclease wie der S1-Nuclease verdaut und dann die Bindungsfähigkeit auf Nitrocellulose getestet, so erhält man ein eindeutiges Ergebnis: Bleibt die Bindungsfähigkeit erhalten, so ist diese auf die Anwesenheit von Proteinen zurückzuführen; geht sie jedoch verloren, so wurde die Nitrocellulosebindung durch Einzelstrangbereiche verursacht.

Um den Einfluß störender Proteine auszuschalten, wurde bei der Untersuchung auf Nitrocellulosebindung die DNA sehr gut gereinigt. Kerne, Überstand und Matrix wurden in einer Sarcosyl-haltigen Lösung lysiert und anschließend mit Proteinase K behandelt (2.2.10). Es folgte eine zweimalige Bandung im isopyknischen CsCl-Gradienten. Ferner wurde die NaCl-Konzentration auf 3 M und die Harnstoff-Konzentration auf 5 M eingestellt und 1 Std. mit Phenol pH 9 phenolisiert. Mit dieser Methode wurden alle Proteine entfernt, die nicht zu den „most tightly bound proteins" (132, 133) gehören. Bei diesen handelt es sich um Proteine, deren Bindung an die DNA eine Alkalibehandlung übersteht und die vermutlich kovalent an die Polynucleotidketten gebunden sind. Abgesehen von diesen wahrscheinlich kovalent gebundenen Proteinen werden alle weiteren Proteine entfernt (79). Das OD_{260}/OD_{280}-Verhältnis, das als Maßstab für die Reinheit der DNA-Präparation gewertet werden kann, wurde routinemäßig gemessen und zeigte stets einen Wert von 1,9.

Die Proben wurden sowohl auf Säulen faseriger Nitrocellulose (Collodiumwolle E 1250, Wolff Walsrode AG) als auch auf Nitrocellulosefilter (SM 11 308, Sartorius) aufgetragen. Die Durchführung der Nitrocellulose-Chromatographie an Säulen erfolgte nach 2.2.17 in Anlehnung an Probst et al. (80); diejenige an Filtern nach 2.2.18 in Anlehnung an Stumpf (81). Bei dem Filterbindungstest war in Vorarbeiten (81) gezeigt worden, daß die Durchflußgeschwindigkeit eine spezifische Bindung neusynthetisierter DNA an die Filter gewährleistet und die gebundene Radioaktivität innerhalb eines großen Bereiches unabhängig von aufgetragener DNA-Menge und -Konzentration ist. Säulenchromatographie und Filterbindungstest liefern sehr ähnliche Ergebnisse (81).

In Tabelle 5 sind die erhaltenen Werte der Bindung an Nitrocellulosesäulen und -filter für replizierende und in Replikationsruhe befindliche DNA dargestellt. Bei der 20 Std.-langzeitmarkierten DNA wurden einige Versuche mit angeschlossenem 1stündigem Chase durchgeführt; die Ergebnisse unterschieden sich jedoch nicht, ob ein Chase durchgeführt wurde oder nicht. In der Tabelle sind die Prozentzahlen der insgesamt auf Säulen oder Filter aufgetragenen Radioaktivität (gemessen in cpm) dargestellt, welche an Nitrocellulose binden. Es wurde immer so viel Radioaktivität auf die Nitrocellulose gebracht, daß mindestens 10 000 cpm an dieses Material banden. Im allgemeinen hielten die Filter mehr Radioaktivität bei Pulsmarkierung als die Säulen zurück (ausgenommen bei der kryolysierten Matrix-DNA, wo das gleiche Ergebnis geliefert wird). Bei der Langzeitmarkierung wurden von Säulen und Filtern gleiche Anteile der Radioaktivität gebunden. Vielleicht liegt der Grund für die erhöhte Bindung pulsmarkierter Proben an Filtern in einem etwas anderen Mechanismus als bei der Bindung an Säulen, der bei nicht replizierender DNA nicht in Erscheinung tritt.

Tabelle 5
Nitrocellulosebindung von Kern-, Überstand-, Matrix- und kryolisierter Matrix-DNA an Nitrocellulosesäulen und Nitrocellulosefilter. Dargestellt sind die Werte für 4 min-^{3}H-dThd-Pulsmarkierungen und 20 Std.-^{14}C-dThd-Langzeitmarkierungen (Mittelwert ± Standardabweichung; n = Anzahl der Versuche) für unverdaute sowie S1-Nuclease-verdaute Proben als Prozent der an Nitrocellulose adsorbierten cpm.

	Nitrocellulosesäule		Nitrocellulosefilter	
	unverdaut	S1-verdaut	unverdaut	S1-verdaut
4 min-^{3}H-dThd-Puls:				
Kern-DNA	10,0 ± 5,1 (n = 5)	2,3 ± 1,8 (n = 4)	16,3 ± 3,7 (n = 5)	2,0 ± 0,7 (n = 3)
Überstand-DNA	3,2 ± 3,2 (n = 4)	0,9 ± 0,7 (n = 4)	4,0 ± 1,9 (n = 5)	0,6 ± 0,4 (n = 4)
Matrix-DNA	46,9 ±14,6 (n = 4)	2,4 ± 1,4 (n = 2)	59,7 ± 7,3 (n = 4)	3,6 ± 0,4 (n = 2)
kryolysierte Matrix-DNA	23,4 ± 8,6 (n = 2)	4,4 ± 0,6 (n = 2)	24,3 ± 4,3 (n = 2)	4,4 ± 0,9 (n = 2)
20 Std.-^{14}C-dThd-Markier.				
Kern-DNA	3,1 ± 2,0 (n = 5)	1,3 ± 0,9 (n = 4)	3,0 ± 0,8 (n = 5)	1,2 ± 0,5 (n = 4)
Überstand-DNA	1,2 ± 0,8 (n = 5)	0,8 ± 0,6 (n = 4)	1,1 ± 0,6 (n = 5)	0,4 ± 0,2 (n = 4)
Matrix-DNA	22,6 ± 6,1 (n = 4)	3,9 ± 0,8 (n = 2)	22,5 ± 5,6 (n = 4)	3,6 ± 1,8 (n = 2)
kryolysierte Matrix-DNA	9,7 ± 2,8 (n = 2)	4,0 ± 1,2 (n = 2)	7,3 ± 0,2 (n = 2)	2,7 ± 1,1 (n = 2)

Bevor die S1-Nuclease-verdauten Proben auf die Nitrocellulose aufgetragen wurden, wurde das Enzym durch kurze Phenolisierung entfernt. In Kontrollversuchen wurde gezeigt, daß bei dieser Vorgehensweise (a) Einzelstrang-DNA durch das Enzym

vollständig abgebaut wurde, (b) Doppelstrang-DNA durch S1-Nuclease völlig intakt blieb und (c) diese Phenolisierung keinen Einfluß auf den Anteil Nitrocellulose-bindender DNA hatte. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 6 und 7 dargestellt.

Tabelle 6
Prozent DNA, die nach Verdau mit S1-Nuclease säurefällbar sind, bezogen auf die ursprünglich vorhandene Radioaktivität (mindestens 3 000 cpm).

	^{3}H-dThd-4 min-pulsmark. DNA	^{14}C-dThd-20 Std.-markierte DNA
Kern-DNA[a]	102,8%	99,0%
Überstand-DNA[a]	101,5%	102,1%
Matrix-DNA[a]	99,9%	99,0%
Kern-DNA[b]	98,9%	99,3%
Überstand-DNA[b]	99,3%	98,9%
Matrix-DNA[b]	102,1%	101,3%
Denaturierte Maus-DNA		8,8%[c]
Native Maus-DNA		101,3%

a ohne zusätzliche 3 M NaCl/5 M Harnstoff/Phenol-Behandlung

b mit zusätzlicher 3 M NaCl/5 M Harnstoff/Phenol-Behandlung

c dieser Wert entspricht dem Anteil schnell renaturierenden Mäusesatellits

Tabelle 7
Einfluß einer kurzen Phenolisierung auf die Nitrocellulose-bindung der DNA-Proben. Differenz der Bindung in % bezogen auf die Ergebnisse vor der Phenolisierung. Mittelwerte aus vier Messungen.

Kern-DNA	0,79%
Überstand-DNA	0,19%
Matrix-DNA	1,96%

Aus Tabellen 6 und 7 geht hervor, daß unter den gewählten Bedingungen (Salzkonzentration, pH-Wert, Enzym/DNA-Mengenverhältnis) der S1-Verdau vollständig und spezifisch für Einzelstrang-DNA ist, während Doppelstrang-DNA nicht abgebaut wird. Bei Kern-, Überstand- und Matrix-DNA sind keine signifikanten Mengen säurelöslichen Materials nach S1-Verdau zu beobachten. Das läßt darauf schließen, daß keine großen Einzelstrang-DNA-Bereiche in den DNAs vorhanden sind. Durch die kurze Phenolisierung zur Entfernung der S1-Nuclease wird die Adsorption an Nitrocellulose nicht verändert.

Da die Matrix-DNA-Fragmente wesentlich größer als die Fragmente der Überstand-DNA sind, wurde ihre Größe durch Kryolyse nach Lyskov und Moshkovsky herabgesetzt. Durch mehrmalige Wiederholung eines Vorganges, bei dem die DNA innerhalb sehr kurzer Zeit auf -196°C gebracht und anschließend aufgetaut wird, entstehen stochastisch Brüche, wobei die Position eines Bruches unabhängig von der Lage der anderen Bruchstellen ist. Damit diese Methode für die nachfolgende Untersuchung der Nitrocellulosebindung verwendbar ist, muß sichergestellt sein, daß dabei keine Einzelstrangbereiche erzeugt werden. Die Überprüfung kryolysierter λ-DNA ergab Bindung an Nitrocellulose von 0,9% (77). Das ist ein Wert, wie man ihn für wiederholte Chromatographie einer nicht bindenden DNA findet. Eine Überprüfung von λ-DNA auf Nitrocellulosebindung ergab (H. Probst, persönliche Mitteilung) bei 16 Versuchen einen Mittelwert ± Standardabweichung von 0,65% ± 0,45%. Das bedeutet, daß alle Werte bei der Nitrocellulosebindung (vgl. Tabelle 5), die kleiner oder gleich 1,0-1,1% sind, als Hintergrundwerte gelten müssen. Da kryolysierte λ-DNA innerhalb dieses Wertes liegt, kann daraus geschlossen werden, daß durch die Kryolyse keine Einzelstrangbereiche entstehen und die Methode in Hinsicht auf unsere Fragestellung eingesetzt werden kann.

In Abb. 23-26 sind die Profile für zwei Experimente dargestellt, in denen die Matrix-DNA kryolysiert wurde. In der

Legende zu den Abbildungen sind die mittleren Molekulargewichte (relativ zur radioaktiven Markierung) der jeweiligen DNAs wiedergegeben. Die Abb. 27 und 28 stellen die Profile für die S1-Nuclease-verdauten DNAs des gleiches Versuches von Abb. 25 und 26 dar. In der Legende sind wiederum die mittleren Molekulargewichte aufgeführt. Man erkennt deutlich, daß einerseits durch die Kryolyse die Molekulargewichte deutlich herabgesetzt werden, andererseits durch den S1-Nuclease-Verdau die Molekulargewichte erneut verringert werden, sowohl für die nicht-kryolysierte als auch für die kryolysierte Matrix-DNA, und zwar auf ca. die Hälfte. Daraus kann geschlossen werden, daß die Einzelstrangbereiche, die durch S1-Nuclease beseitigt werden, mitten in den Molekülen liegen. Aufgrund des geringen mittleren Molekulargewichtes bei pulsmarkierter Matrix-DNA ist zu vermuten, daß die Einzelstrangbereiche häufiger vorkommen als in der nicht-replizierenden DNA.

Da durch die Kryolyse die Molekulargewichte der Matrix-DNA nicht auf dieselbe Größe wie die der Überstand-DNA gebracht werden können, ist eine Normierung notwendig, um einen exakten Vergleich der Werte von Tabelle 5 durchführen zu können. Diese Normierung ist in Tabelle 8 wiedergegeben.

Abb. 23-28: Sedimentation von Matrix-DNA, kryolysierter Matrix-DNA, S1-Nuclease-verdauter Matrix-DNA und S1-Nuclease-verdauter kryolysierter Matrix-DNA in einem linearen Sucrosegradienten (5-30% Sucrose in 10 mM Tris/HCl pH 7,8, 0,2 M NaCl, 1 mM EDTA) mit 0,5 ml 60% Sucrosekissen. Versuch (a): Abb. 23 und 24; Versuch (b): Abb. 25-28. Zentrifugationsbedingungen: SW 40 Ti-Rotor, 39 000 rpm, 4°C, 8 Std. (1 Fraktion entspricht 1,1 S). Sedimentation von links nach rechts. $\bar{M}$ = mittleres Molekulargewicht.
——— = ^{3}H-DNA (4 min-Puls); ——— = ^{14}C-DNA (20 Std.-Markier.)
Die Kryolyse wurde nach 2.2.15 durchgeführt.

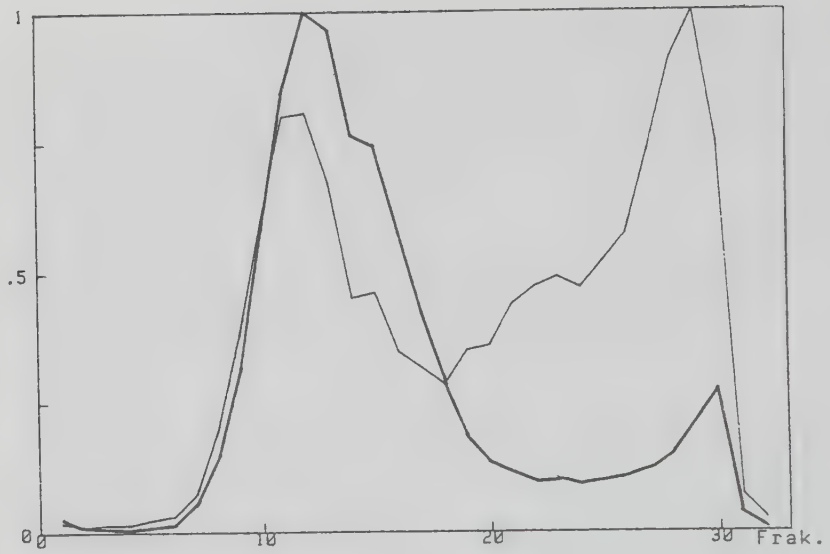

Abb. 23: Versuch (a), Matrix-DNA. cpm im Maximum: ^{3}H = 6 220, ^{14}C = 2 633. $\overline{M}(^{3}H)$ = 13,82·10^{6} D; $\overline{M}(^{14}C)$ = 28,09·10^{6} D

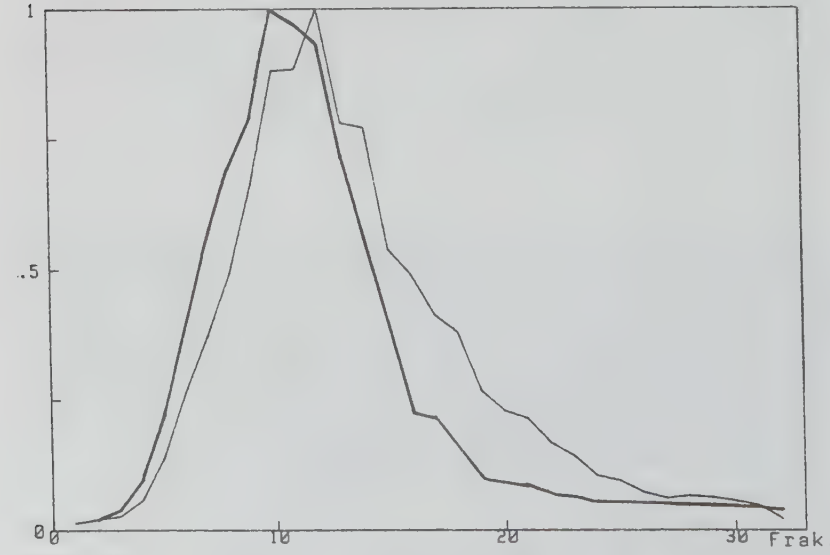

Abb. 24: Versuch (a), kryolysierte Matrix-DNA. cpm im Maximum: ^{3}H = 10 648, ^{14}C = 6 177. $\overline{M}(^{3}H)$ = 7,21·10^{6} D; $\overline{M}(^{14}C)$ = 9,67·10^{6} D

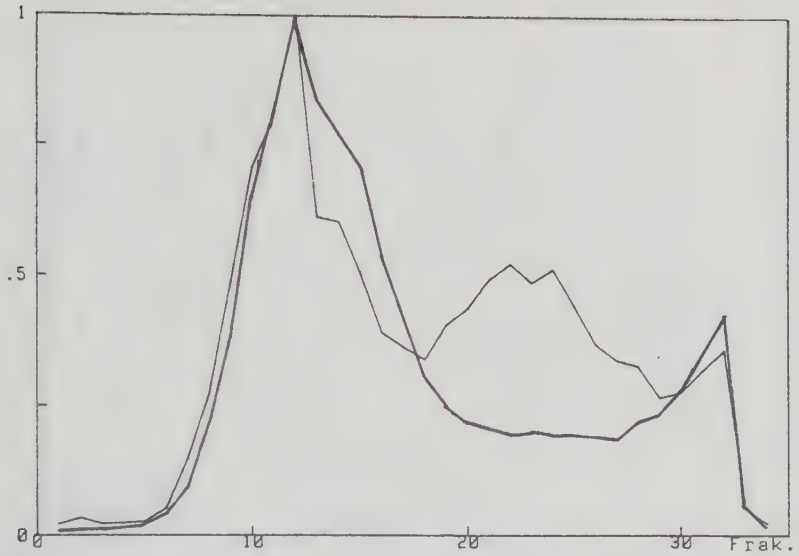

Abb. 25: Versuch (b), Matrix-DNA. cpm im Maximum: ^{3}H = 11 562, ^{14}C = 1 321. $\overline{M}(^{3}H) = 20{,}81 \cdot 10^{6}$ D; $\overline{M}(^{14}C) = 23{,}05 \cdot 10^{6}$ D

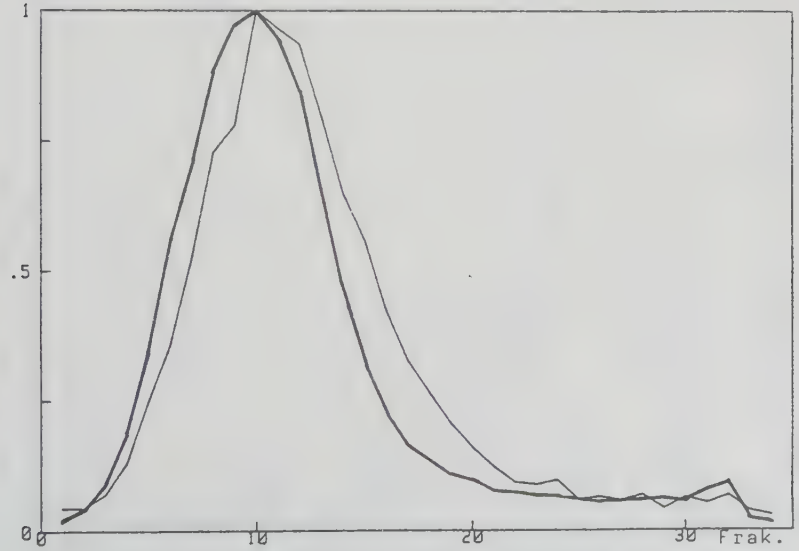

Abb. 26: Versuch (b), kryolysierte Matrix-DNA. cpm im Maximum: ^{3}H = 8 269, ^{14}C = 933. $\overline{M}(^{3}H) = 8{,}04 \cdot 10^{6}$ D; $\overline{M}(^{14}C) = 8{,}81 \cdot 10^{6}$ D

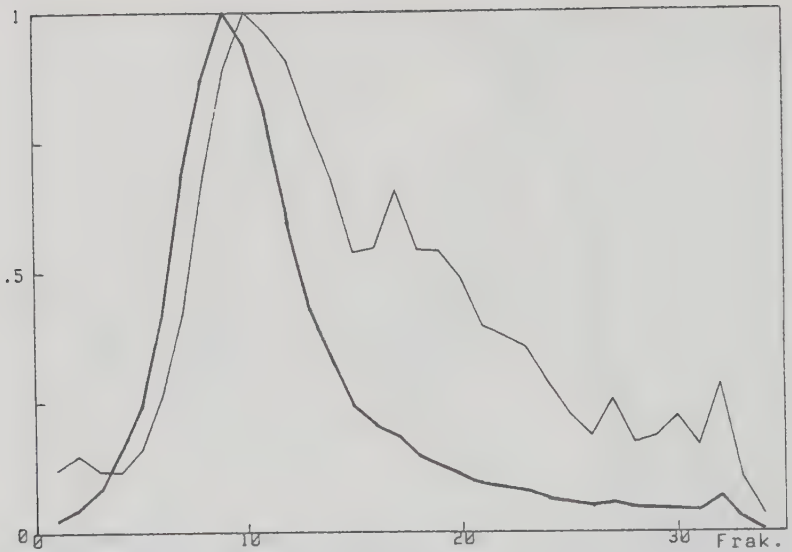

Abb. 27: Versuch (b), S1-verdaute Matrix-DNA. cpm im Maximum: ^{3}H = 16 557, ^{14}C = 939. $\overline{M}(^{3}H) = 7{,}72 \cdot 10^{6}$ D; $\overline{M}(^{14}C) = 15{,}95 \cdot 10^{6}$ D

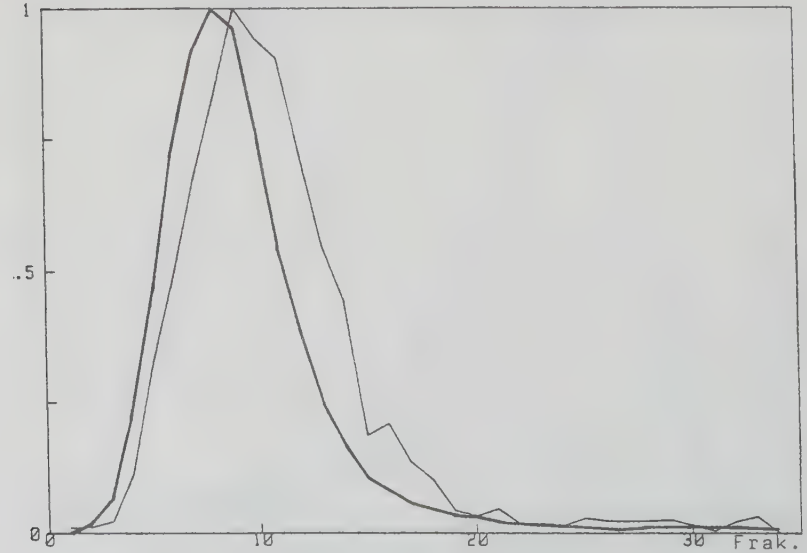

Abb. 28: Versuch (b), S1-verdaute kryolysierte Matrix-DNA. cpm im Maximum: ^{3}H = 11 680, ^{14}C = 946. $\overline{M}(^{3}H) = 3{,}53 \cdot 10^{6}$ D; $\overline{M}(^{14}C) = 5{,}10 \cdot 10^{6}$ D

Tabelle 8

Vergleich der Nitrocellulosebindung von Kern-, Überstand-, Matrix- und kryolysierter Matrix-DNA nach Normierung auf das Molekulargewicht (Mittelwerte ± Standardabweichung; n = Anzahl der Versuche). $\overline{M}_{cpm}$ = mittleres Molekulargewicht des Markierung tragenden DNA-Anteils bezogen auf Radioaktivität.

	$\overline{M}_{cpm} \cdot 10^{-6}$ D unbehandelt	$\overline{M}_{cpm} \cdot 10^{-6}$ D nach S1-Verd.	Bindung an Nitrocellulose in %* unbehandelt	Bindung / $\overline{M}_{cpm}$	Bindung an Nitrocellulose in %* nach S1-Verd.	Bindung / $\overline{M}_{cpm}$
4 min-^{3}H-dThd-Puls:						
Kern-DNA	7,1 ± 1,2 (n = 2)	-	13,2 ± 5,3 (n = 10)	1,86±0,81	2,1 ± 1,4 (n = 7)	-
Überstand-DNA	3,8 ± 0,4 (n = 2)	-	3,6 ± 2,4 (n = 9)	0,95±0,64	0,7 ± 0,5 (n = 8)	-
Matrix-DNA	16,6 ± 3,7 (n = 3)	7,72 (≙ 46%)	53,3 ±12,7 (n = 8)	3,21±1,05	3,0 ± 1,1 (n = 4)	0,389
kryol.Mat.-DNA	7,6 ± 0,6 (n = 2)	3,53 (≙ 46%)	23,8 ± 5,6 (n = 4)	3,13±0,78	4,4 ± 0,6 (n = 4)	1,246
20 Std.-^{14}C-dThd-Markierung:						
Kern-DNA	6,9 ± 0,1 (n = 2)	-	3,0 ± 1,4 (n = 10)	0,43±0,20	1,3 ± 0,7 (n = 8)	-
Überstand-DNA	5,3 ± 1,1 (n = 2)	-	1,2 ± 0,7 (n = 10)	0,23±0,14	0,6 ± 0,4 (n = 8)	-
Matrix-DNA	25,4 ± 2,5 (n = 3)	15,95 (≙ 62%)	22,6 ± 5,4 (n = 8)	0,89±0,23	3,8 ± 1,2 (n = 4)	0,238
kryol.Mat.-DNA	9,2 ± 0,6 (n = 2)	5,10 (≙ 55%)	8,5 ± 2,1 (n = 4)	0,92±0,24	3,3 ± 1,2 (n = 4)	0,647

* gemittelt über die Werte von Säule und Filter (Tabelle 5)

Berücksichtigt man ferner den oben angegebenen Wert von 0,65 ± 0,45 (Mittelwert ± Standardabweichung) als Leerwert für die Nitrocellulosebindung und bestimmt aufgrund dessen, wieviel Mikrometer DNA zwischen zwei Nitrocellulose-Bindungspunkten im Durchschnitt vorhanden sind, so ergeben sich die in Tabelle 9 enthaltenen Werte.

Tabelle 9
Bestimmung der durchschnittlichen Abstände zwischen Nitrocellulose-Bindungspunkten aus den Angaben der Tabelle 8 unter Berücksichtigung des Leerwertes der Nitrocellulosebindung.

	korrigierte Bindung an Nitrocellulose in % nach Abzug des Hintergrundes; unbehandelt	µm DNA zwischen zwei Bindungspunktes; berechnet nach $\frac{\bar{M}_{cpm} \cdot 100}{2 \cdot 10^6 \cdot \text{Bindung (in \%)}}$
4 min-^{3}H-dThd-Puls:		
Kern-DNA	12,55 ± 5,23	28,3
Überstand-DNA	2,95 ± 2,44	64,4
Matrix-DNA	52,65 ±12,71	15,8
kryolysierte Matrix-DNA	23,15 ± 5,62	16,4
20 Std.-^{14}C-dThd-Langzeitmarkierung:		
Kern-DNA	2,35 ± 1,47	146,8
Überstand-DNA	0,55 ± 0,83	481,8
Matrix-DNA	21,95 ± 5,42	57,9
kryolysierte Matrix-DNA	7,85 ± 2,15	58,6

Faßt man die Ergebnisse der Tabellen 5-9 zusammen, so ergibt sich ein eindeutiges Bild: Matrix-DNA enthält sowohl in pulsmarkierter als auch in langzeitmarkierter Form eine erhöhte

Zahl von Bindungspunkten an Nitrocellulose. Das ist für pulsmarkierte DNA nicht besonders verwunderlich, da bekannt ist, daß replizierende DNA Einzelstrangbereiche enthält (vgl. z.B. (95)) und in der Literatur und in dieser Arbeit (3.1.2) gezeigt werden konnte, daß replizierende DNA mit der Matrix assoziiert ist. Elektronenmikroskopisch wurde nachgewiesen, daß der Kernmatrix-DNA-Komplex aus HeLa-Zellkernnucleoiden nach Verdau mit der Restriktionsendonuclease Eco RI an Replikationsgabeln angereichert ist (134).

Wesentlich interessanter ist die Erkenntnis, daß auch nichtreplizierende Matrix-DNA Nitrocellulose-bindend ist. In der Literatur ist eine Arbeit erschienen (62), in der die Nitrocellulosebindung von Matrix-DNA untersucht wurde. Aus den erhaltenen Daten wurde geschlossen, daß diese mit sehr fest gebundenen Proteinen assoziiert ist, welche die Bindung vermitteln. Ob die Bindung jedoch auf die Existenz von Einzelstrangbereichen zurückzuführen ist, wurde in der Publikation nicht berücksichtigt. Einen Aufschluß über das Vorliegen von Einzelstrang-DNA erhält man durch enzymatischen Verdau mit S1-Nuclease, welche unter sorgfältig ausgewählten Bedingungen lediglich Einzelstrangbereiche angreift und auflöst. Wird Matrix-DNA mit diesem Enzym verdaut, so nimmt die Nitrocellulosebindung stark ab (Tabelle 5). Ebenfalls wird das Molekulargewicht der Matrix-DNA ungefähr halbiert (Abb. 27 und 28). Beide Ergebnisse sind nicht zu deuten, wenn man die Nitrocellulosebindung ausschließlich auf die Existenz von Proteinen zurückführt.

In (62) erhält man wesentlich höhere Bindungswerte als in Tabelle 5. Dieses ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß die DNA-Aufarbeitung bei weitem nicht so viele Proteine entfernt hat wie die in dieser Arbeit verwendete Reinigungsmethode. Aufgrund dessen sind die quantitativen Aussagen von (62) zu revidieren.

Nach Verdau von Matrix-DNA mit S1-Nuclease wird die Nitrocellulosebindung nicht auf einen Hintergrundwert erniedrigt wie das bei Überstand-DNA der Fall ist (Tabelle 5). Deshalb wird die Schlußfolgerung gezogen, daß Proteine neben den Einzelstrangbereichen für die Nitrocellulosebindung verantwortlich sind. Auf die Bindung von Proteinen an die DNA wird in (63) eingegangen. Allerdings wurde bisher keine DNA-Struktur gefunden, die für die Bindung verantwortlich ist. Weiter unten in der vorliegenden Dissertation wird gezeigt, daß bestimmte nichtreplizierende DNA-Stücke (sog. nonnascent pieces) sehr fest mit Matrixproteinen verbunden sind. Es ist anzunehmen, daß diese zusammen mit Einzelstrangbereichen vorkommen, eventuell in der Form von „displacement loops" (siehe unten).

Berechnet man analog zu den Werten in Tabelle 9 die Länge der DNA zwischen zwei Bindungspunkten für S1-Nuclease-verdaute Proben und vergleicht den ermittelten Wert mit demjenigen aus Tabelle 9, so erhält man die Aussage, daß jeder dritte Bindungspunkt von nichtreplizierender DNA S1-Nuclease-unempfindlich ist. Das bedeutet, daß in nichtreplizierender DNA Einzelstrangbereiche und sehr fest gebundene Proteine auftreten, wobei die Einzelstrangbereiche etwas häufiger vorkommen.

Über die Länge der Einzelstrangbereiche kann nichts Definitives ausgesagt werden. Da durch isopyknische Zentrifugation (3.2.2) und Hydroxyapatit-Chromatographie (3.2.3) keine Anhaltspunkte für Einzelstrang-DNA gefunden werden können und die Menge an freigesetzten Mono- (Di-) Nucleotiden beim S1-Nuclease-Verdau zu gering ist, um erfaßt werden zu können (Tabelle 6), liegt die Schlußfolgerung nahe, daß die Einzelstrangbereiche kurz sein müssen. In Vorarbeiten (135, 136) war festgestellt worden, daß Ehrlich-Ascites-DNA einer Länge von mehr als 150 Nucleotiden zu 100% an Nitrocellulose unter den gewählten Testbedingungen adsorbiert ist. Bei einer Länge von 30 bis 150 Nucleotiden erfolgt die Adsorption nur

partiell. Daher beträgt die Länge der Einzelstränge vermutlich mindestens 30 bis 150 Nucleotide. Untersuchungen mit synthetischen Homopolymeren (136) ergaben, daß adsorbierte DNA einer Länge von weniger als 150 Nucleotiden vermutlich reich an poly(dT)-, poly(dGdT)- oder poly(dAdC)-Abschnitten ist.

Bei dem Hinweis auf das Vorliegen von Einzelstrang-DNA-Bereichen wurde die Tatsache ausgenutzt, daß die Bindung an Nitrocellulose nach Verdau mit S1-Nuclease verringert wird. S1-Nuclease-sensitive Stellen wurden auch bei Z-DNA (137) und kreuzförmigen Strukturen (138, 139) beschrieben. Es ist jedoch sehr unwahrscheinlich, daß diese Strukturen die Nitrocellulosebindung vermitteln. Synthetisches poly(dGdC) bindet nicht an Nitrocellulose (136), und bekanntlich ist Z-DNA-Struktur bei Vorhandensein von poly(dGdC) gefunden worden (140). Außerdem ist der Mittelpunkt des B $\rightleftharpoons$ Z-Überganges erst bei 2,5 M NaCl erreicht, bei voll methyliertem Cytosin bei 0,7 M NaCl (141); unter physiologischen Bedingungen wird nur dann die Z-DNA-Form erhalten, wenn die DNA als Superhelix vorliegt (137). Beide Bedingungen (hohe Salzkonzentrationen, superhelikale DNA) liegen bei unseren Untersuchungen jedoch nicht vor. Ebenfalls wären kreuzförmige Strukturen auf relativ kurzen DNA-Abschnitten unter den gewählten Testbedingungen nicht stabil (142).

Eine Nitrocellulosebindung, die durch sehr fest gebundene Proteine vermittelt wird, kann durch S1-Nuclease-Verdau nur dadurch aufgehoben werden, daß die Verbindung zwischen dem Protein und der DNA durch einen einzelnen DNA-Strang vermittelt wird, der aber zu klein ist, um selber eine Bindung hervorzurufen. Bisher konnten jedoch keine Anhaltspunkte erhalten werden, die diese Möglichkeit untermauern.

3.3 Untersuchung der matrixgebundenen DNA auf „nonnascent pieces"

3.3.1 Allgemeines

Kurze DNA-Ketten, die als Okazaki-Stücke bezeichnet werden, kommen bei der diskontinuierlichen und semidiskontinuierlichen Replikation der DNA in Prokaryonten und Eukaryonten vor (95, 129, 143). Ferner tritt eine weitere Klasse kurzer DNA-Ketten auf, die nicht als Replikationsintermediate aufzufassen sind. Sie wurden in Bakterien (65, 144) und von Kowalski und Denhardt (66) in Eukaryonten gefunden; diese Autoren prägten den Begriff „nonnascent pieces". Ihre Herkunft und Funktion sind bisher unbekannt; ihre Länge unterscheidet sich nicht wesentlich von derjenigen der Replikationsintermediate (66). Die Isolierung der nonnascent pieces aus Ehrlich-Ascites-DNA wurde von Probst et al. mittels thermischer Hydroxyapatit-Chromatographie durchgeführt (64). Sie erhielten 0,3-0,4% der Gesamt-DNA in Form kurzer Ketten. Über 95% davon gehörten zu den nonnascent pieces und hatten eine geringe Umsatzrate. Die Lebensdauer dieser Stücke betrug ca. eine Zellgeneration.

Probst et al. (64) untersuchten, ob die nonnascent pieces, die über Wasserstoffbrücken gebunden in langen helikalen DNA-Bereichen vorkommen, bezüglich der Nitrocellulose-Bindungsstellen bevorzugt auftreten oder nicht. Sie kamen zu dem Schluß, daß sie in Nähe dieser Bindungsstellen auftreten. Daher war es naheliegend, matrixgebundene DNA auf ihren Gehalt an nonnascent pieces hin zu überprüfen mit dem Hintergedanken, daß diese Stücke an der Verankerung der nichtreplizierenden DNA beteiligt sein könnten (64).

3.3.2 Isolierung der nonnascent pieces

Die Isolierung der nonnascent pieces erfolgte nach 2.2.20. Hydroxyapatitsäulen ermöglichen eine Fraktionierung von DNA nach Basenzusammensetzung, Reassoziationsrate oder Sekundärstruktur des denaturierten Moleküls (145). Mittels der

thermischen Hydroxyapatit-Chromatographie besteht eine Möglichkeit, diejenigen Teile eines DNA-Moleküls abzutrennen, welche bei geringen Temperaturen schmelzen (118, 146). Dazu gehören die nonnascent pieces, die kurze Stücke darstellen und somit bereits zu einem früheren Zeitpunkt aus dem helikalen Molekül herausschmelzen. Durch Verwendung von $NaClO_4$ kann der Temperaturbereich für die Fraktionierung erniedrigt werden (147).

Probst et al. (64) fanden heraus, daß Okazaki-Stücke und nonnascent pieces in einem Puffersystem aus 0,12 M Natriumphosphat, 5 M $NaClO_4$, pH 5,5 in einem Temperaturbereich von 20-55°C eluiert werden, während die Rest-DNA erst oberhalb dieser Temperatur vom Hydroxyapatit getrennt werden kann. Diejenige Fraktion, welche die thermischen Eluate von 20°C bis 55°C enthielt („55°C-Fraktion"), wurde für die weitere Untersuchung der nonnascent pieces gewählt.

Da in der 55°C-Fraktion nur wenig DNA enthalten ist, muß im Auffanggefäß Carrier-DNA vorgelegt werden. Anderenfalls geht eine nicht kontrollierbare Menge an kurzen Stücken durch Adsorption an der Gefäßwand verloren. Ferner müssen alle Dialysierschritte nach Gewinnung der Stücke in einem Schlauch mit geringer Ausschlußgröße durchgeführt werden, um nicht die kleinen Stücke bei der Aufarbeitung zu verlieren. Sämtliche in dieser Arbeit durchgeführte Dialysen mit der 55°C-Fraktion wurden daher in einem Spectrapor 3-Schlauch (Spectrum Medical Industries Inc., Los Angeles) mit einer Ausschlußgröße von 3 500 D gemacht.

Ein kritischer Punkt bei der thermischen Hydroxyapatit-Chromatographie ist die Wahl des Säulenabschlusses unter dem Hydroxyapatit. Bei Versuchen mit Glasfaserfiltern wurden stets unterschiedliche Werte für die 55°C-Fraktion erhalten. Daher wurde in einem Versuch ermittelt, ob sich durch Verwendung von Papierfiltern andere Werte als bei Glasfaserfiltern ergeben.

1 µg einer mit ^{3}H-dThd langzeitmarkierten Ehrlich-Ascites-DNA in 10 µl 0,1 TEBS-Puffer wurde jeweils mit 990 µl E1-Puffer (0,1 M Natriumphosphat pH 7,0), E2-Puffer (0,16 M Natriumphosphat pH 7,0) bzw. E3-Puffer (0,12 M Natriumphosphat, 5 M $NaClO_4$, pH 5,5) versetzt, 10 min bei 100°C gekocht, sofort auf Eis gegeben und bei 15 mm Hg Unterdruck auf GF/C-Filtern (Whatman) oder Papierfiltern (Macherey und Nagel) von 24 mm ø abgesaugt. Die erhaltenen Ergebnisse finden sich in Tabelle 10. Aus ihr geht hervor, daß GF/C-Filter in Anwesenheit von $NaClO_4$ sehr viel einzelsträngige DNA binden und somit zur Gewinnung von nonnascent pieces ungeeignet sind. Erst beim Auftragen weiterer DNA auf die Filter während der thermischen Hydroxyapatit-Chromatographie (z.B. in der 60°C-Fraktion) wird die 55°C-Fraktion-DNA (nonnascent pieces) verdrängt und erscheint in der „falschen" nachfolgenden Fraktion.

Tabelle 10
Bindung einzelsträngiger (hitzedenaturierter) Maus-DNA an Papier- und Glasfaserfiltern in Anwesenheit von E1- und E2-Puffer (0,1 bzw. 0,16 M Natriumphosphat pH 7,0) oder E3-Puffer (0,12 M Natriumphosphat, 5 M $NaClO_4$, pH 5,5). Aufgetragen wurden jeweils 64 300 cpm. Angegeben sind die Prozentwerte der wiedergefundenen Radioaktivität.

	GF/C-Filter	Papier-Filter
E1-Puffer	1,20%	3,49%
E2-Puffer	2,09%	3,92%
E3-Puffer	43,47%	0,41%

$NaClO_4$ bewirkt, daß Glasfaserfilter 100mal so viel Einzelstrang-DNA wie Papierfilter binden.

In Tabelle 11 ist ein typisches Ergebnis bei der Untersuchung der Anteile von nonnascent pieces an Überstand- und Matrix-DNA wiedergegeben. In der 55°C-Fraktion der Matrix-DNA waren stets zwischen 2,5- und 3mal so viel Radio-

aktivität enthalten wie in der entsprechenden Fraktion der Überstand-DNA (ausgedrückt als Prozent der jeweils aufgetragenen Radioaktivität). Die Matrix-DNA enthält ebenso vermehrt Okazaki-Stücke. Wie weiter unten gezeigt wird, sind die nonnascent pieces der Matrix-DNA kürzer als die der Überstand-DNA. Somit ist der Wert 2,5-3mal so häufig für diese Stücke mit Sicherheit eine Unterschätzung.

Tabelle 11
Anteile ^{3}H-4 min-pulsmarkierter kurzer DNA-Ketten (nascent pieces, Okazaki-Stücke) und ^{14}C-20 Std.-langzeitmarkierter kurzer DNA-Ketten (nonnascent pieces) an der markierten DNA der Gesamt-Kerne, Überstand- und Matrix-Fraktion. Angaben in Prozent der mit thermischer Hydroxyapatit-Chromatographie aufgetrennten Gesamt-DNA-Markierungen.

	Gesamt-Kerne	Überstand-Fraktion	Matrix-Fraktion
4 min-^{3}H-dThd-Puls:			
bei Entproteinisierung freigesetzte kurze Ketten	0,3	0,3	1,3
aus helikaler DNA herausschmelzbare kurze Ketten	4,1	3,5	10,2
gesamt	4,4	3,8	11,5
20 Std.-^{14}C-dThd-Markierung:			
bei Entproteinisierung freigesetzte kurze Ketten	0,045	0,04	0,09
aus helikaler DNA herausschmelzbare kurze Ketten	0,58	0,48	1,22
gesamt	0,63	0,52	1,31

3.3.3 Überprüfung der 55°C-Fraktion auf Artefakte

Durch das Schneiden der DNA mit dem Enzym Bsp RI können kurze Fragmente entstehen. Werden diese auf die Hydroxyapatit-Säule mit der Rest-DNA aufgetragen, so können sie aufschmelzen und kurze Stücke (Okazaki-Stücke bzw. nonnascent pieces) vortäuschen. Daher war es nötig festzustellen, welchen Anteil Bsp RI-Fragmente an der Gesamtzahl der 55°C-Fraktion ausmachen.

Dazu wurde die fragmentierte DNA aus Überstand und Matrix auf ein 5%iges nicht denaturierendes Gel aufgetragen und bestimmt, welchen Anteil die kleinen Fragmente der gleichen Größenordnung wie die uns interessierenden Stücke an der Gesamt-DNA ausmachen. Die erhaltenen Profile aus dem Gel sind in Abb. 29 und 30 und die daraus erhaltene Rechnung in Tabelle 12 enthalten. Als „Längenstandards" wurden die Farbstoffe Xylen-Cyanol-FF und Bromphenolblau gewählt; diese wandern wie Doppelstrang-DNA einer Länge von 260 bzw. 65 Nucleotidpaaren unter den gleichen Bedingungen (148).

Tabelle 12
Anteile der ^{3}H-dThd-4 min-Pulsmarkierung und ^{14}C-dThd-20 Std.-Langzeitmarkierung, die in einem 5%igen nicht denaturierenden Polyacrylamid-Gel schneller als Doppelstrang-DNA von 500 Basenpaaren Länge wandern. Angaben in %.

	Überstand-DNA[a]	Überstand-DNA[b]	Matrix-DNA[a]	Matrix-DNA[b]
4 min-^{3}H-dThd-Pulsmarkierung	1,084	2,367	0,030	0,313
20 Std.-^{14}C-dThd-Markierung	0,878	1,796	0,007	0,031

a bezogen auf die eingesetzte Radioaktivität
b bezogen auf die auf dem Gel wiedergefundene Radioaktivität

Abb. 29 und 30: Elektrophorese der Bsp RI-Fragmente von Überstand- und Matrix-DNA in einem 5%igen nicht denaturierenden Polyacrylamidgel. Die Pfeile geben die Position der Marker Xylen-Cyanol-FF (XCFF) und Bromphenolblau (BPB) an. Ordina-

te: Prozent der aufgetragenen Radioaktivität. ▬▬ = ^{3}H-DNA, ——— = ^{14}C-DNA.

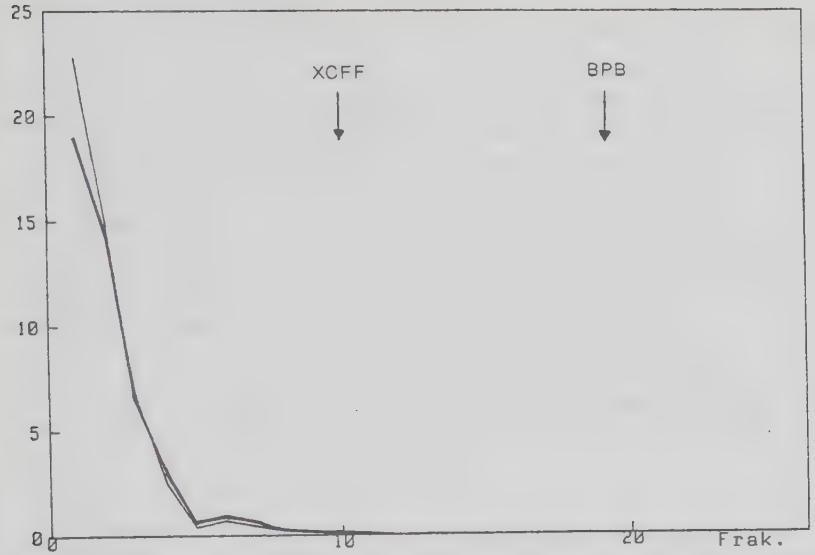

Abb. 29: Überstand-DNA. Aufgetragene Mengen (wiedergefundene Mengen): ^{3}H = 336 260 cpm (45,8%); ^{14}C = 123 795 cpm (48,9%)

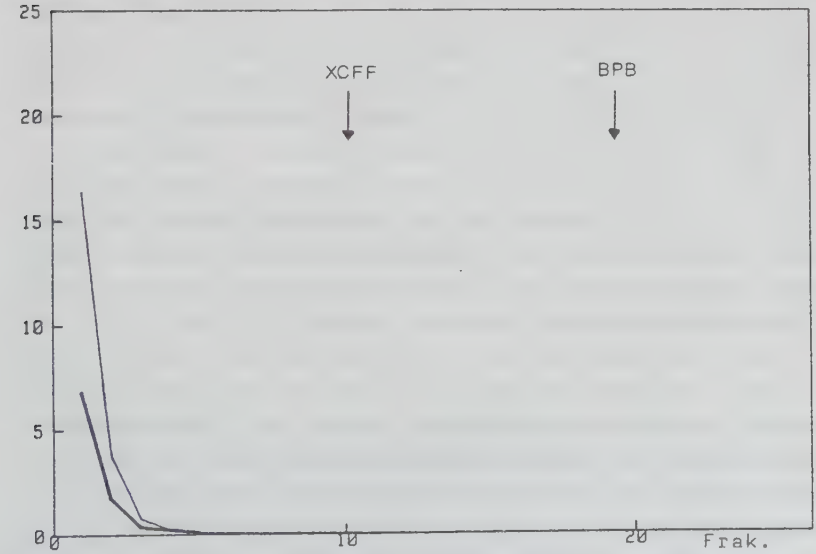

Abb. 30: Matrix-DNA. Aufgetragene Mengen (wiedergefundene Mengen): ^{3}H = 571 550 cpm (9,7%); ^{14}C = 23 870 cpm (21,2%)

3.3.4 Untersuchung der nonnascent pieces auf Reassoziationseigenschaften

Mittels der Analyse von Reassoziationskinetiken lassen sich mehrere molekularbiologisch wichtige Bestimmungen durchführen (149): Organisation der DNA in singuläre und repetitive Sequenzen, Bestimmung der Anteile dieser Sequenzklassen an der Gesamt-DNA und ihrer relativen Anordnung zueinander; Anordnung von Strukturgenen im Verhältnis zu den repetitiven Sequenzen; evolutionärer Abstand verschiedener DNAs und RNAs; Anzahl der exprimierten Gene in beliebigen Zellen und Vergleich der Expressionsmuster in verschiedenen Zellarten, u.U. auch von verschiedenen Organismen; Sequenzunterschiede zwischen nuclearer hnRNA und cytoplasmatischer mRNA.

Bei den vorliegenden Untersuchungen sollte bestimmt werden, ob die nonnascent pieces der Matrix-DNA schnell reassoziierend sind und ob sie sich in ihrem Reassoziationsverhalten von denen der Überstand-DNA unterscheiden. Nimmt man nämlich an, daß die nonnascent pieces der Matrix-DNA an der Verankerung der DNA an die Kernmatrix beteiligt sind, so wäre es durchaus denkbar, daß die DNA-Stücke alle die gleiche oder eine ähnliche Sequenz haben. Jeppesen und Bankier (150) hatten beim Chinesischen Hamster gefunden, daß diejenigen DNA-Fragmente, welche mit Metaphasen-Chromosomen assoziiert sind, an schnell reassoziierenden Sequenzen angereichert sind. Daher wurde eine $c_o t$-Kurve aufgenommen und das Verhalten von Überstand- und Matrix-DNA-nonnascent pieces mit Gesamt-Ehrlich-Ascites-DNA verglichen.

Um eine möglichst hohe spezifische Aktivität in die DNA zu bringen, wurde eine Langzeitmarkierung mit ^{32}P-Orthophosphat durchgeführt. Die kurzen DNA-Stücke tragen daher eine ^{32}P-Markierung. Die Vergleichs-DNA wurde mit ^{3}H-dThd langzeitmarkiert.

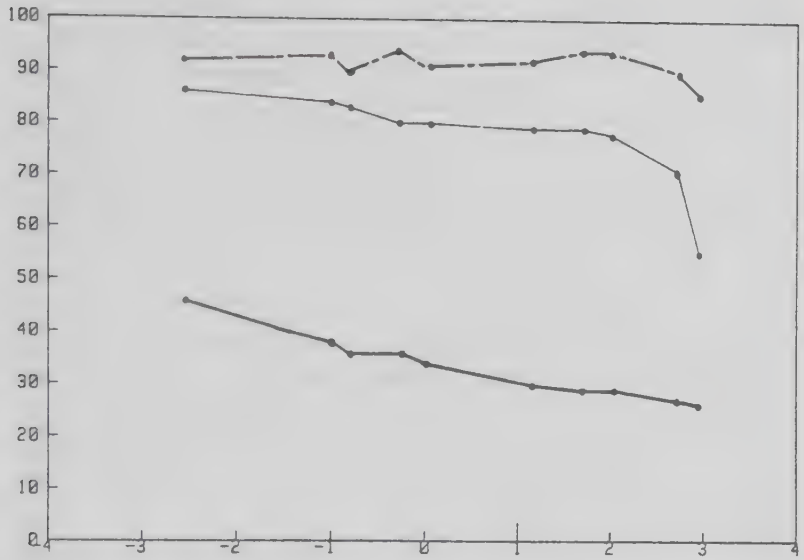

Abb. 31: Reassoziationskinetik von kurzen Stücken (nonnascent pieces) von Überstand- und Matrix-DNA sowie von Ehrlich-Ascites-Gesamt-DNA, gemessen durch Hydroxyapatit-Chromatographie. Abszisse: lg $c_o t$; Ordinate: % nichtreassoziierte DNA.
– – – – = ^{32}P-markierte nonnascent pieces der Überstand-DNA
——— = ^{32}P-markierte nonnascent pieces der Matrix-DNA
——— = ^{3}H-markierte Gesamt-DNA, ultraschallfragmentiert

In Abb. 31 sind die erhaltenen Kurven wiedergegeben. Der obere Teil des $c_o t$-Diagramms (lg $c_o t > 3$) wurde nicht aufgenommen, weil er für unsere Fragestellung ohne Bedeutung ist. Deutlich erkennbar ist die Tatsache, daß die kleinen Stücke der Matrix-DNA im Vergleich zur Gesamt-DNA schnell reassoziierend sind, während diejenigen der Überstand-DNA langsamer als die Gesamt-DNA reassoziieren und vermutlich unique-Sequenzen darstellen. Da der Anfangswert der kleinen Stücke der Matrix-DNA bei 46% nichtreassoziierter DNA liegt, wäre es interessant, ob durch Verringerung des $c_o t$-Wertes dieser Wert zunimmt. Die experimentellen Hindernisse machen dieses Vorhaben jedoch nicht möglich. Wird nämlich die DNA-Konzentration um einen Faktor von 10 erniedrigt (nur in diesem

Fall erhält man eine sinnvolle Erniedrigung des c_0t-Wertes), so ist die Radioaktivitätsmenge in den Stücken so gering, daß die erhaltenen cpm-Werte nicht mehr auszuwerten sind. Sinn einer Erniedrigung des c_0t-Wertes wäre eine Entscheidung darüber, ob die schnelle Reassoziation auf inverted repeat-Strukturen oder auf hochrepetitive Sequenzen zurückzuführen ist. Obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, daß inverted repeats vorkommen, ist die Hydroxyapatit-Bindung bei niedrigem c_0t-Wert wahrscheinlich aber auf hochrepetitive Sequenzen zurückführbar, wie in 3.4 erläutert wird.

In den Voreluaten von Überstand- und Matrix-DNA bei der thermischen Hydroxyapatit-Chromatographie (Ausspülungen der Hydroxyapatit-Säule mit E1-, E2- und E3-Puffer bei Raumtemperatur) sind DNA-Stücke enthalten, die ebenso wie die nonnascent pieces der Überstand-DNA vermutlich unique-Sequenzen darstellen (Abb. 32).

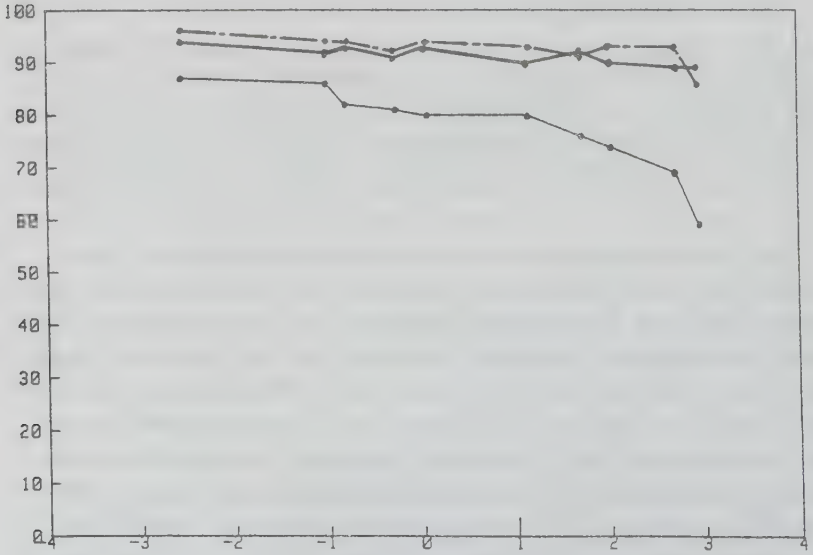

Abb. 32: Reassoziationskinetik von Voreluat-DNA-Stücken aus der thermischen Hydroxyapatit-Chromatographie von Überstand- und Matrix-DNA sowie von Ehrlich-Ascites-Gesamt-DNA, gemessen durch Hydroxyapatit-Chromatographie. Abszisse: lg c_0t, Ordinate: % nichtreassoziierte DNA.

= ^{32}P-markierte Voreluat-Stücke von Überstand-DNA
= ^{32}P-markierte Voreluat-Stücke von Matrix-DNA
= ^{3}H-markierte Gesamt-DNA, ultraschallfragmentiert

3.3.5 Hydroxyapatit-Chromatographie von nonnascent pieces

Mittels der Hydroxyapatit-Chromatographie lassen sich einzelsträngige und doppelsträngige DNA voneinander trennen (vgl. 3.2.3). Aufgrund der hohen Reassoziationsgeschwindigkeit der nonnascent pieces der Matrix-DNA war zu vermuten, daß ein beträchtlicher Teil dieser Stücke basengepaart vorliegt. Um dieses zu überprüfen, wurde eine Hydroxyapatit-Chromatographie durchgeführt (Abb. 33).

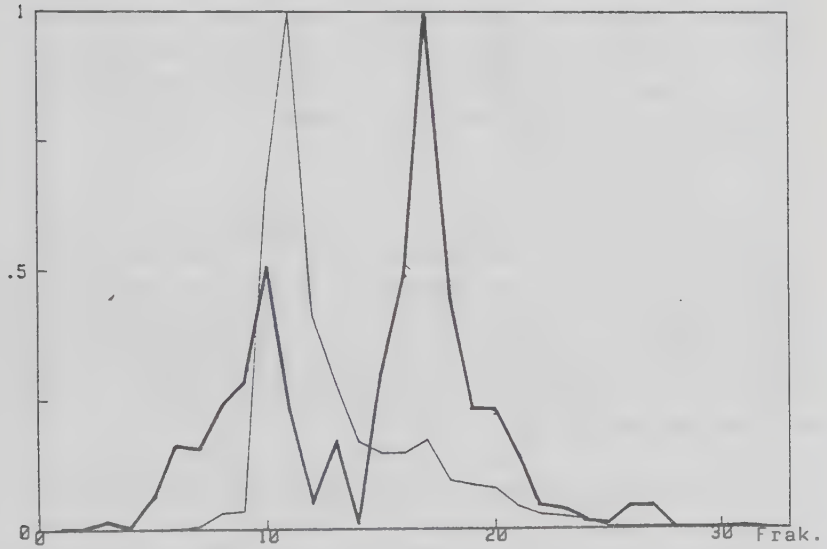

Abb. 33: Hydroxyapatit-Chromatographie der nonnascent pieces der Matrix-DNA und einer nach 2.2.12 isolierten Ehrlich-Ascites-DNA, die alkalisch denaturiert wurde. Säulenvolumen: 2 ml; Säulendurchmesser: 9 mm. Elutionspuffer: 0,05-0,4 M Natriumphosphat pH 7,0; Fraktionsgröße: 0,8 ml.
——— = ^{32}P-markierte nonnascent pieces; cpm im Maximum: 1290
——— = ^{3}H-markierte denaturierte Maus-DNA; cpm im Max.: 9368

Aus der Abbildung geht hervor, daß ein beträchtlicher Teil der Radioaktivität im Doppelstrang-Bereich eluiert wird. Das bedeutet, daß die Stücke miteinander reassoziiert sind und Doppelstrangbereiche ausbilden. Ob das auf die Existenz von inverted repeats zurückzuführen ist oder ob repetitive Se-

quenzen für die Reassoziation verantwortlich sind, kann mit dieser Methode nicht entschieden werden. Es ist mittels der hier durchgeführten Chromatographie auch nicht zu entscheiden, ob die Stücke vollständig miteinander reassoziieren, d.h. ob zwei Stücke ein doppelsträngiges Molekül derselben Länge ergeben, oder ob die Stücke jeweils mit einem Teil an ein zweites Stück und mit dem anderen Teil an ein drittes Stück reassoziieren. In diesem letzten Fall würden sehr hochmolekulare Netzwerke entstehen. Aus der Bestimmung des Molekulargewichts der nonnascent pieces durch Zonensedimentation im Sucrosegradienten und aufgrund sehr scharfer Peaks bei der isopyknischen Zentrifugation im Ag^{+}/Cs_2SO_4-Gradienten (s.u.) kann geschlossen werden, daß solche Netzwerke tatsächlich auftreten.

Die Elution von nonnascent pieces im Einzelstrangbereich bei der Hydroxyapatit-Chromatographie (Abb. 33) braucht nicht unbedingt zu bedeuten, daß tatsächlich Einzelstränge vorliegen. Reassoziieren zwei nonnascent pieces miteinander und bilden sie einen Doppelstrangbereich von weniger als ca. 30 Basenpaaren aus, so werden sie als Einzelstränge eluiert, obwohl sie miteinander verknüpft sind (124).

3.3.6 Größenbestimmung der nonnascent pieces

Kowalski und Denhardt zeigten für 3T3-Zellen, daß die nonnascent pieces kleiner als 100 Nucleotide sind (66). Probst et al. bestimmten für Ehrlich-Ascites-Tumorzellen Größen der Stücke von ca. 60-300 Nucleotiden (64). Mittels Gelelektrophorese und Sedimentationsläufen in der Ultrazentrifuge wurde eine Bestimmung der Größe der nonnascent pieces durchgeführt. In Abb. 34 ist das Ergebnis der Elektrophorese in einem denaturierenden 5%igen Formamid-Polyacrylamidgel wiedergegeben. Man erkennt, daß die nonnascent pieces der Matrix-DNA zwei Gipfel aufweisen: einen um 50 Nucleotide und einen anderen bei einer Länge von mehr als 1000 Nucleotiden; die Größe der nonnascent pieces der Überstand-DNA

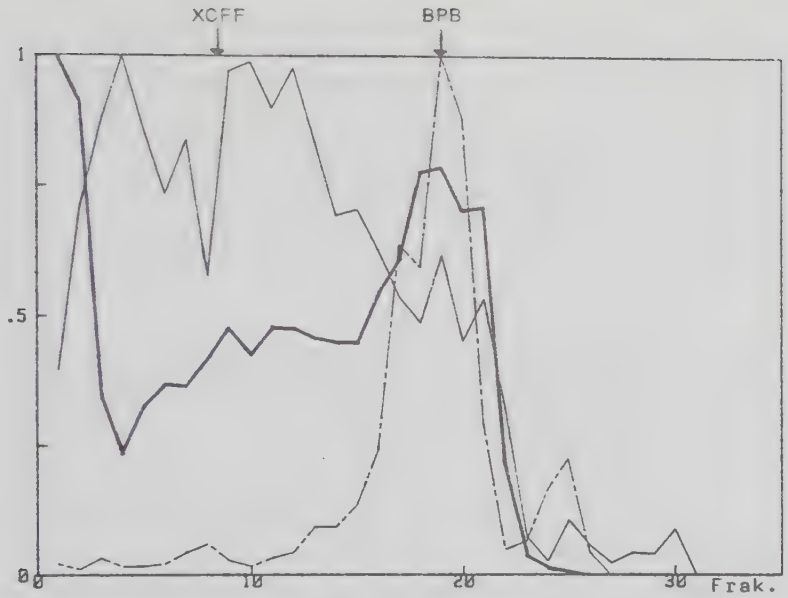

Abb. 34: Elektrophorese der nonnascent pieces der Überstand- und Matrix-DNA sowie von S1-Nuclease-verdauten nonnascent pieces der Matrix-DNA in einem denaturierenden 5%igen Formamid-Polyacrylamidgel nach 2.2.27. Die Pfeile geben die Position von Xylen-Cyanol-FF (XCFF) und Bromphenolblau (BPB) an. Alle nonnascent pieces sind ^{32}P-markiert.
——— = nonnascent pieces der Matrix-DNA; cpm im Maximum: 1992
—·—·— = S1-verdaute nonnascent pieces der Matrix-DNA; cpm im Maximum: 182
– – – = nonnascent pieces der Überstand-DNA; cpm in Max.: 445

liegt zwischen beiden. Der Gipfel von mehr als 1000 Nucleotiden stellt jedoch höchstwahrscheinlich ein Artefakt dar und ist nicht auf Stücke einer derartigen Länge zurückzuführen. Als Elektrodenpuffer bei der Elektrophorese dient nämlich 0,09 M Tris/HCl pH 8,2, 0,09 M Borsäure, 2,5 mM EDTA. Wird die Probe mit den nonnascent pieces der Matrix-DNA auf das Gel aufgetragen, so ist es durchaus möglich, daß aufgrund der hohen Reassoziationstendenz der Stücke hochmolekulare Netzwerke gebildet werden, da der Überschuß an Elektrodenpuffer eine Reassoziation ermöglichen kann. Daher wird vorgeschlagen, bei der Durchführung der Elektrophorese von non-

nascent pieces der Matrix-DNA einen Stoff in den Elektrodenpuffer hinzuzufügen, der das Entstehen von Doppelstrang-DNA verhindert. Das Profil nach vorhergehendem Verdau der Stücke mit S1-Nuclease unterstützt den Vorschlag, daß sich im Elektrodenpuffer vor dem Eindringen in das Gel Netzwerke ausbilden. Durch Verdau der Einzelstrangbereiche liegen keine Netzwerke mehr vor, und die Stücke dringen vollständig in das Gel ein.

Ein weiterer Punkt muß bei der Interpretation der Gelelektrophorese-Ergebnisse berücksichtigt werden. Weiter unten wird gezeigt, daß die nonnascent pieces der Matrix-DNA sehr fest an Proteine gebunden sind. Bodnar et al. (63) zeigten, daß HeLa-DNA-Protein-Komplexe nicht in 1%ige Agarosegele bei der Elektrophorese eindringen. Der gleiche Effekt wurde beim Adenovirus-DNA-terminalen Protein-Komplex beobachtet (151, 152). Werner et al. (133) zeigten, daß sehr fest gebundene Proteine aus Ehrlich-Ascites-DNA unter Umständen Selbstaggregation durchführen können und daher nicht in SDS-Polyacrylamidgele eindringen. Es ist nicht auszuschließen, daß ein solcher Effekt bei den Proteinen der nonnascent pieces auftritt und daher das Eindringen der Stücke ins Gel verhindert.

Abb. 35 enthält die Profile einer Elektrophorese in einem nicht denaturierenden Gel. Es gelten die gleichen Überlegungen wie für das denaturierende Gel. Im nativen Gel scheinen die nonnascent pieces der Matrix-DNA Netzwerke sowie Doppelhelices der Länge der Stücke selbst zu bilden.

Die Abb. 36-42 stellen Sedimentationsprofile in alkalischen und neutralen Rohrzuckergradienten dar. In neutralen Gradienten (Abb. 36, 37) findet man einen hochmolekularen Anteil, der in alkalischen Gradienten nicht auftritt (Abb. 38). Will man genauere Analysen der Größe der nonnascent pieces machen, so müssen längere Zentrifugationen durchge-

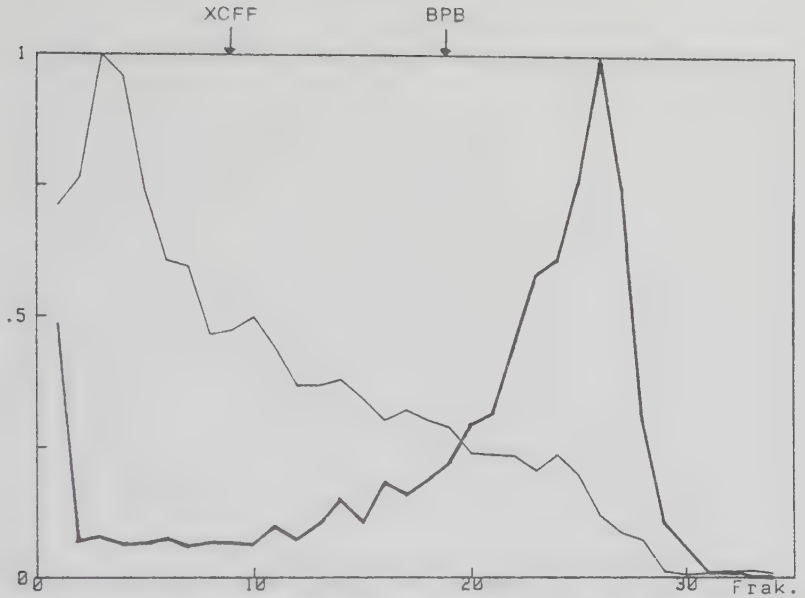

Abb. 35: Elektrophorese der nonnascent pieces der Überstand- und Matrix-DNA in einem nicht denaturierenden 5% Polyacrylamidgel nach 2.2.26. Die Pfeile geben die Position von Xylen-Cyanol-FF (XCFF) und Bromphenolblau (BPB) an. Alle nonnascent pieces sind ^{32}P-markiert.
——— = nonnascent pieces der Matrix-DNA; cpm im Maximum: 961
——— = nonnascent pieces der Überstand-DNA; cpm im Max.: 361

führt werden, wobei im Fall des neutralen Gradienten (Abb. 41) ein beträchtlicher Teil der Radioaktivität durch Netzwerk-Bildung der Stücke auf den Röhrchenboden aufläuft und nicht erfaßt wird.

Es ist schwierig, genaue Angaben zur Länge der nonnascent pieces der Matrix-DNA zu machen, da diese mit Proteinen assoziiert sind (s.u.). Solange keine Angaben zur Größe und Natur (hydrophil, hydrophob) der Proteine vorliegen, kann man keine Korrekturen für die Angaben aus Elektrophorese und Sedimentation machen. Erst nach Berücksichtigung des Proteinanteils sind genaue Längenangaben sinnvoll. Fest steht jedoch, daß es sich bei den nonnascent pieces tatsächlich um kleine Stücke handelt, die wahrscheinlich zwischen 30 und 70 Nucleotide lang sind.

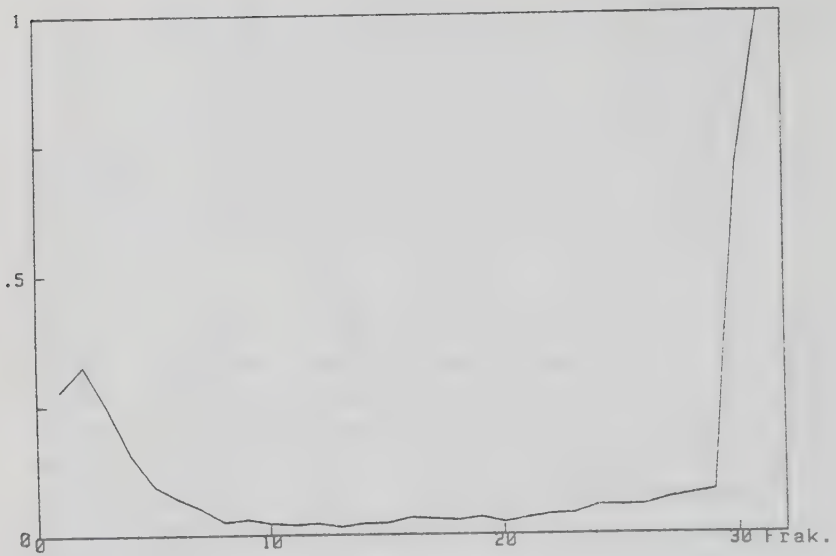

Abb. 36: Sedimentation der nonnascent pieces der Matrix-DNA (^{32}P-markiert) in einem 5-30% linearen Sucrosegradienten (10 mM Tris/HCl pH 7,8, 0,2 M NaCl, 1 mM EDTA) ohne Sucrosekissen. Zentrifugationsbedingungen: SW 40 Ti-Rotor, 39 000 rpm, 4°C, 6 Std. 40 min (1,4 S/Fraktion). Sedimentation von links nach rechts. cpm im Maximum: 2483.

Berücksichtigt man diese Länge der nonnascent pieces der Matrix-DNA und vergleicht sie mit derjenigen der Stücke der Überstand-DNA, die aufgrund von Abb. 34 eine mittlere Länge von 300-400 Nucleotiden haben, so sind die Angaben in 3.3.2 zu revidieren. Dort war festgestellt worden, daß nonnascent pieces in der Matrix-DNA 2-3mal häufiger vorkommen als in der Überstand-DNA. Diese Schlußfolgerung war aufgrund des Anteils an Radioaktivität in der 55°C-Fraktion gezogen worden. Zieht man die geringere Größe der Stücke in der Matrix-DNA in Betracht, so ergibt sich eine ca. 10-20mal so hohe Häufigkeit.

Stellt sich nach Berichtigung des Proteinanteils heraus, daß die Länge der Matrix-DNA-nonnascent pieces tatsächlich um die 50 Nucleotide liegt, bedeutet das für die Reassozia-

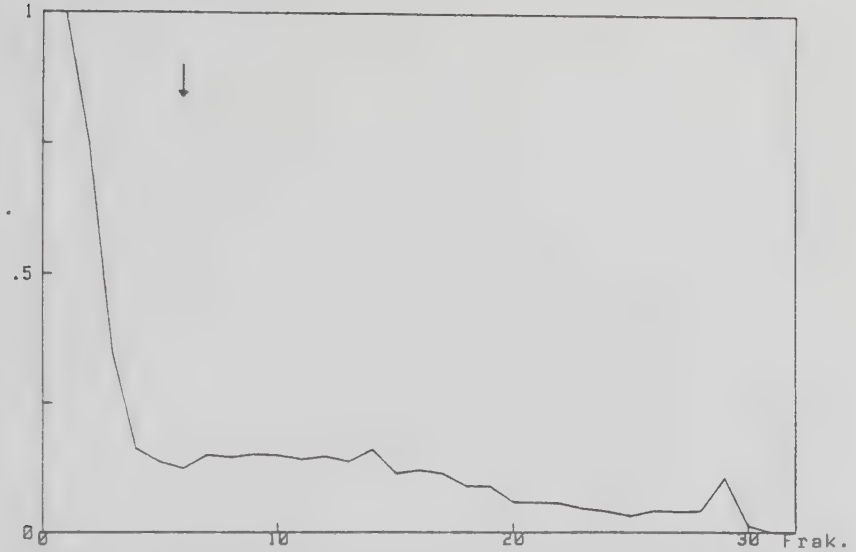

Abb. 37: Sedimentation wie bei Abb. 36, aber mit 0,5 ml 60% Sucrosekissen und 2 Std. Zentrifugationsdauer (6,8 S/Fraktion). Der Pfeil markiert die Lage von λplac5-DNA. cpm im Maximum: 2294.

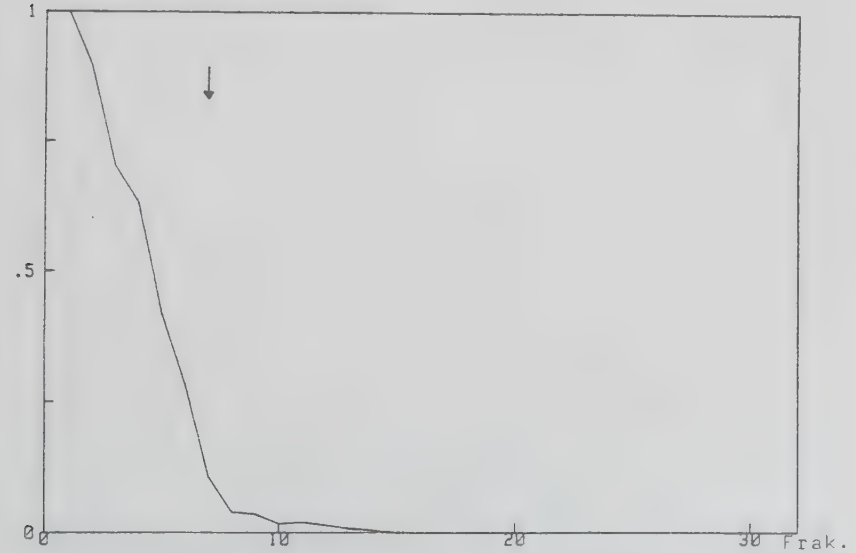

Abb. 38: Sedimentation wie bei Abb. 37, aber im alkalischen Gradienten (0,8 M NaCl, 0,2 M NaOH, 1 mM EDTA) (6,5 S/Fraktion). cpm im Maximum: 2731.

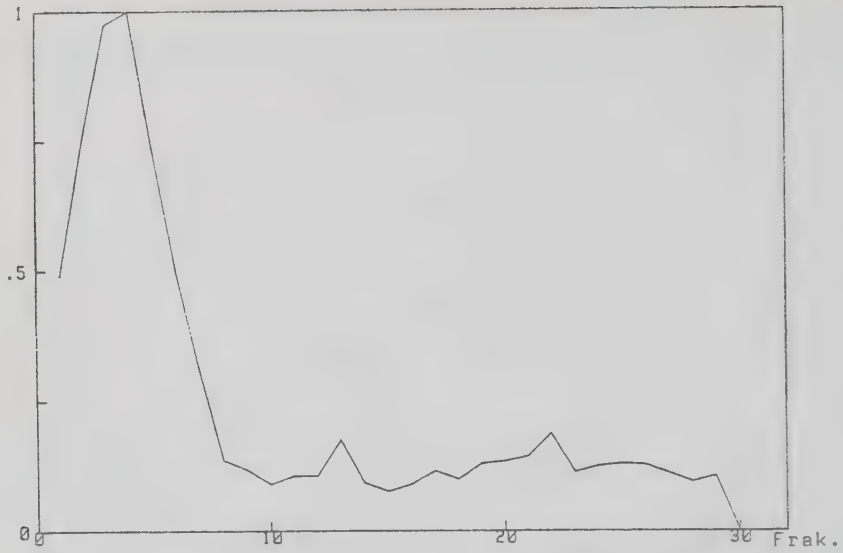

Abb. 39: Sedimentation der nonnascent pieces der Matrix-DNA (^{32}P-markiert) in einem 5-30% linearen alkalischen Sucrosegradienten (0,8 M NaCl, 0,2 M NaOH, 1 mM EDTA) mit 0,5 ml 60% Sucrosekissen. Zentrifugationsbedingungen: SW 40 Ti-Rotor, 39 000 rpm, 4°C, 32 Std. (0,4 S/Fraktion). Sedimentation von links nach rechts. cpm im Maximum: 483.

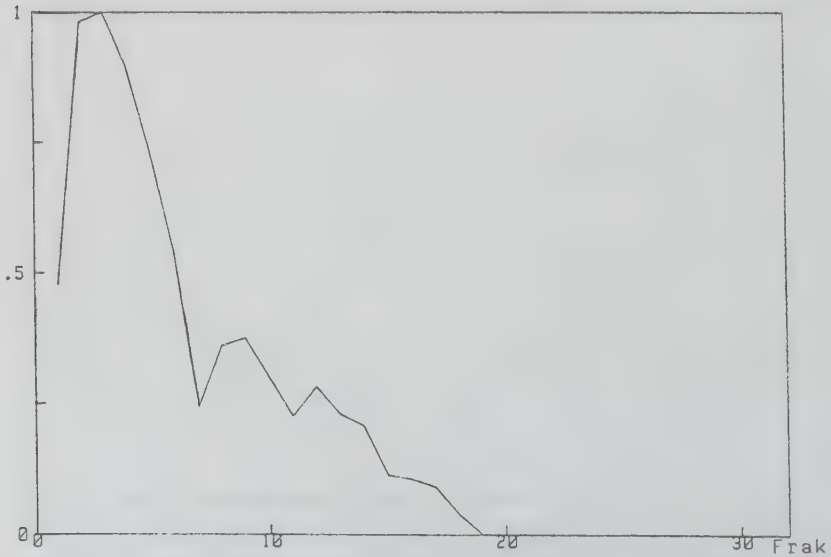

Abb. 40: Sedimentation von S1-Nuclease-verdauten nonnascent pieces der Matrix-DNA wie bei Abb. 39 (0,4 S/Fr.). cpm im Maximum: 337.

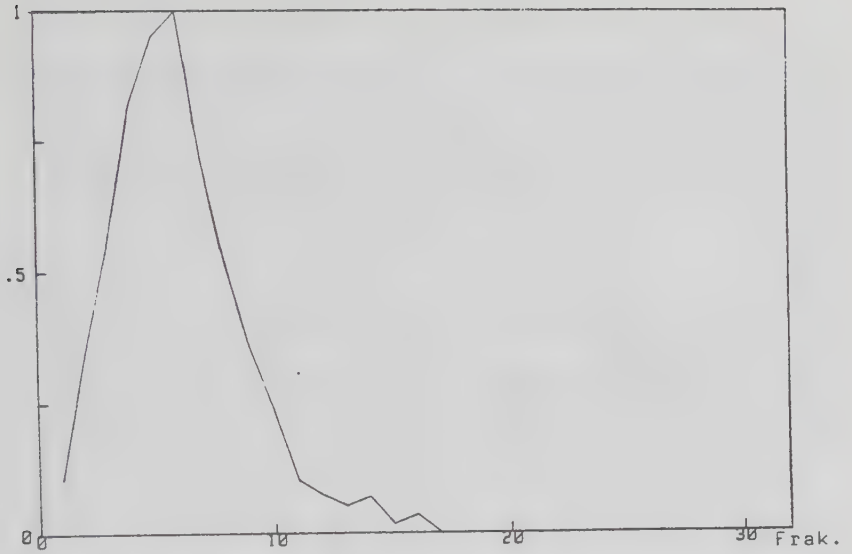

Abb. 41: Sedimentation der nonnascent pieces der Matrix-DNA wie bei Abb. 39, aber im neutralen Gradienten (10 mM Tris/HCl pH 7,8, 0,2 M NaCl, 1 mM EDTA) (0,4 S/Fraktion). cpm im Maximum: 342.

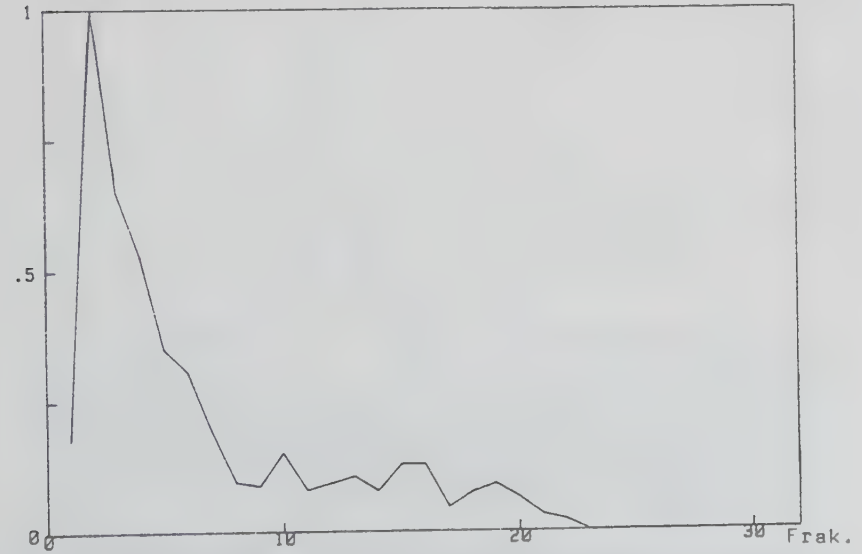

Abb. 42: Sedimentation von S1-Nuclease-verdauten nonnascent pieces der Matrix-DNA wie bei Abb. 39, aber im neutralen Gradienten (s. Abb. 41) (0,4 S/Fraktion). cpm im Maximum: 415

tionskinetik, daß die $c_o t$-Kurve durch hochrepetitive Sequenzen der Stücke verursacht wird. Ein Palindrom bei der geringen Anzahl der Nucleotide könnte keine Hydroxyapatitbindung zustande bringen, da ca. 30 Basenpaare vorliegen müssen, um eine Doppelstrang-DNA-Bindung an Hydroxyapatit zu bewirken (124).

3.3.7 Untersuchung der nonnascent pieces im isopyknischen Gradienten

Werden die nonnascent pieces der Matrix-DNA im Cs_2SO_4-Gradienten isopyknisch zentrifugiert, so erhält man das in Abb. 43 wiedergegebene Profil. Die Stücke erscheinen bei einer

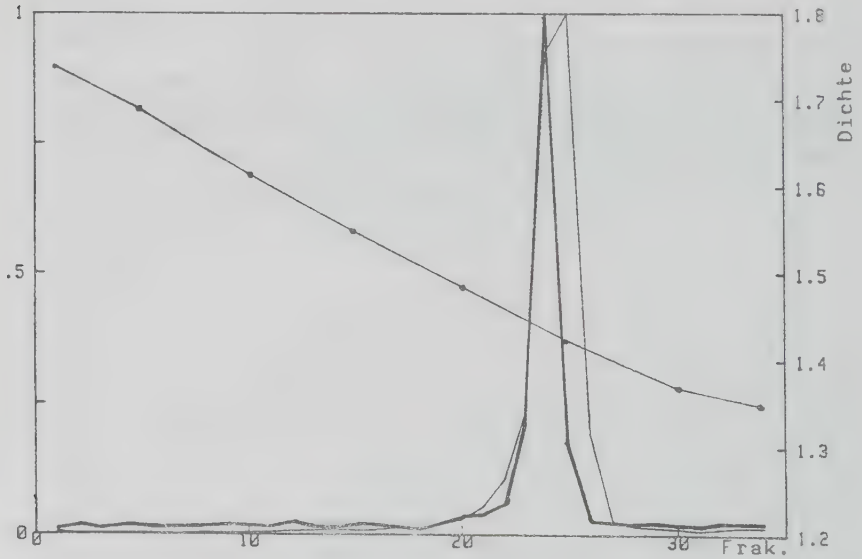

Abb. 43: Isopyknische Zentrifugation von nonnascent pieces der Matrix-DNA (^{32}P-markiert) und einer Referenz-DNA (^{3}H-dThd-langzeitmarkiert) im Cs_2SO_4-Gradienten wie bei Abb. 6.
——— = ^{32}P-nonnascent pieces. cpm im Maximum: 1741
——— = ^{3}H-Referenz-DNA. cpm im Maximum: 19 637
•——• = Dichte

geringfügig höheren Dichte als Referenz-DNA der Maus, was auf eine besondere Basenzusammensetzung oder wahrscheinlicher auf

die Existenz von Einzelsträngen zurückgeführt werden kann. Auffallend ist jedoch vor allem die Peakschärfe, die auf ein hohes Molekulargewicht schließen läßt. Das bedeutet, daß die Stücke unter den Bedingungen des isopyknischen Laufes sehr hochmolekulare Netzwerke bilden.

Führt man eine isopyknische Zentrifugation der nonnascent pieces von Überstand- und Matrix-DNA im Ag^+/Cs_2SO_4-Gradienten durch, so kann einerseits auf das Vorliegen von Einzel- oder Doppelstrangbereichen geschlossen werden, andererseits auf eine eventuelle Anreicherung der Stücke an Sequenzen des Mäusesatelliten. Diese Schlußfolgerung ist naheliegend, da die nonnascent pieces der Matrix-DNA eine hohe Reassoziationsrate zeigen.

Die Ergebnisse sind in Abb. 44-47 dargestellt. Bei unterschiedlichen Ag^+/DNA-Phosphat-Verhältnissen (mit unvollständig bzw. vollständig abgetrenntem Mäusesatelliten) banden die Stücke der Überstand-DNA vorwiegend im Einzelstrangbereich und nur zu einem geringen Teil im Doppelstrangbereich; der Gipfel bei höchster Dichte entspricht dem Einzelstrangbereich. Die Matrix-DNA-Stücke hingegen banden jedoch weder in dem einen noch in dem anderen Bereich; sie erscheinen genau zwischen Einzel- und Doppelsträngen. Auch ein Verdau mit der Einzelstrang-DNA-spezifischen S1-Nuclease verschiebt nicht die Kurve in den Doppelstrangbereich (Abb. 48), obwohl der größte Teil der DNA verdaut wird und nur noch Doppelstränge existieren dürften.

Ein solches Verhalten ist schwer zu erklären. Folgende Denkmöglichkeiten könnten realisiert sein: (a) Die nonnascent pieces sind doppelsträngige Moleküle, die in einen schwereren Dichtebereich durch die Anwesenheit von RNA gebracht werden. (b) Die nonnascent pieces sind einzelsträngige Moleküle, die in einen leichteren Dichtebereich durch die Anwesenheit von Proteinen gebracht werden. (c) Die nonnascent

Abb. 44 und 45: Isopyknische Zentrifugation von nonnascent pieces der Überstand-DNA (^{32}P-markiert) und einer Referenz-DNA (^{3}H-dThd-langzeitmarkiert) im Ag^{+}/Cs_2SO_4-Gradienten wie bei Abb. 6. ▬▬ = nonnascent pieces; ——— = Referenz-DNA; •——• = Dichte.

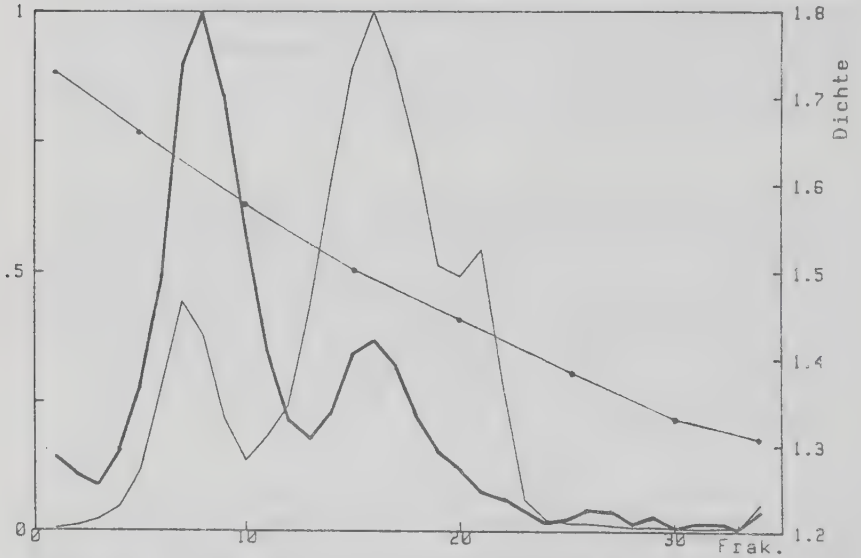

Abb. 44: Ag^{+}/DNA-Phosphat-Verhältnis = 0,22. cpm im Maximum: ^{32}P-nonnascent pieces: 1014; ^{3}H-Referenz-DNA: 141 220.

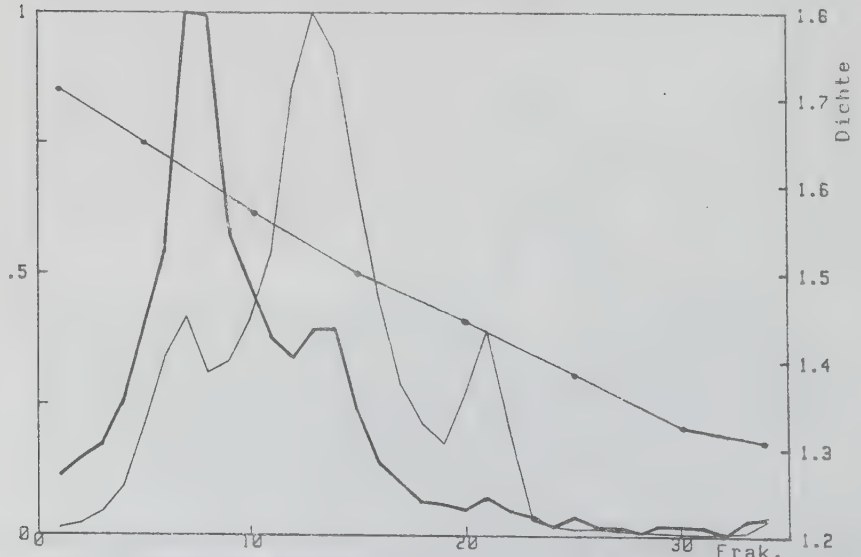

Abb. 45: Ag^{+}/DNA-Phosphat-Verhältnis = 0,27. cpm im Maximum: ^{32}P-nonnascent pieces: 970; ^{3}H-Referenz-DNA: 138 433.

Abb. 46 und 47: Isopyknische Zentrifugation von nonnascent pieces der Matrix-DNA (^{32}P-markiert) und einer Referenz-DNA (^{3}H-dThd-langzeitmarkiert) im Ag^+/Cs_2SO_4-Gradienten wie bei Abb. 6. ▬▬ = nonnascent pieces; ——— = Referenz-DNA; •——• = Dichte.

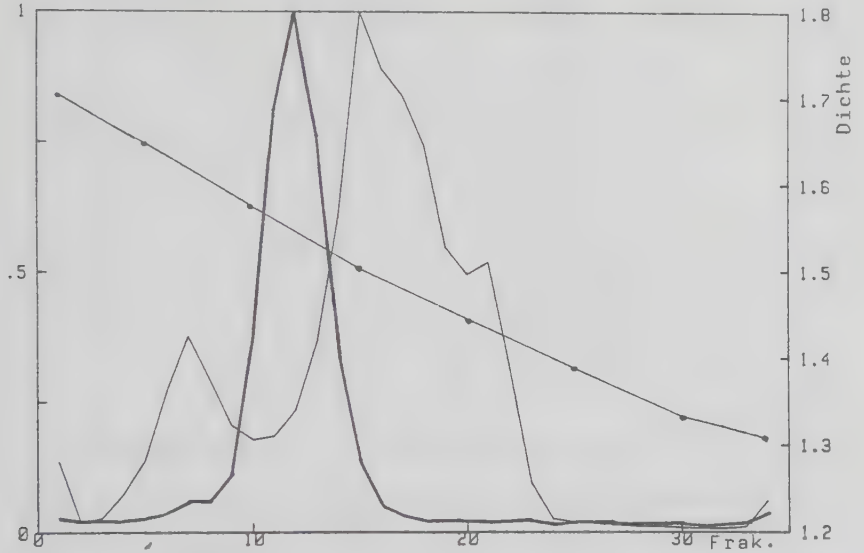

Abb. 46: Ag^+/DNA-Phosphat-Verhältnis = 0,22. cpm im Maximum: ^{32}P-nonnascent pieces: 7007; ^{3}H-Referenz-DNA: 126 245.

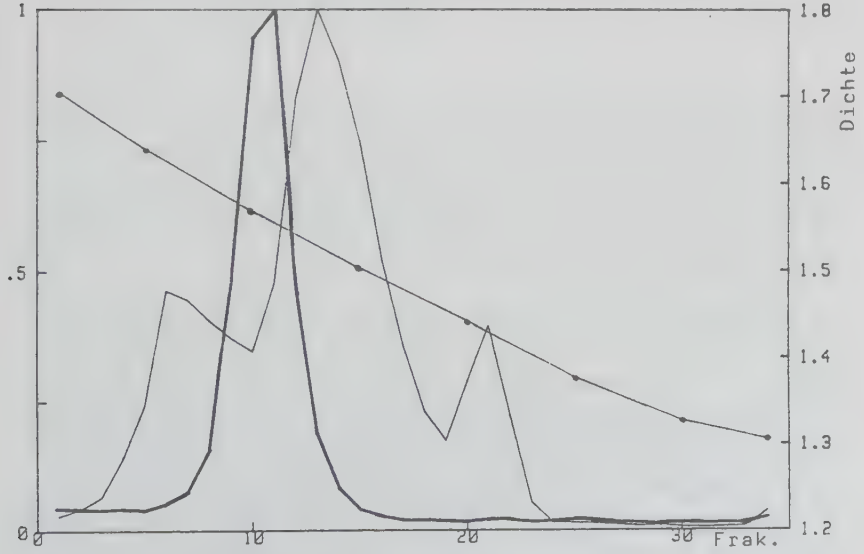

Abb. 47: Ag^+/DNA-Phosphat-Verhältnis = 0,27. cpm im Maximum: ^{32}P-nonnascent pieces: 6483; ^{3}H-Referenz-DNA: 117 907.

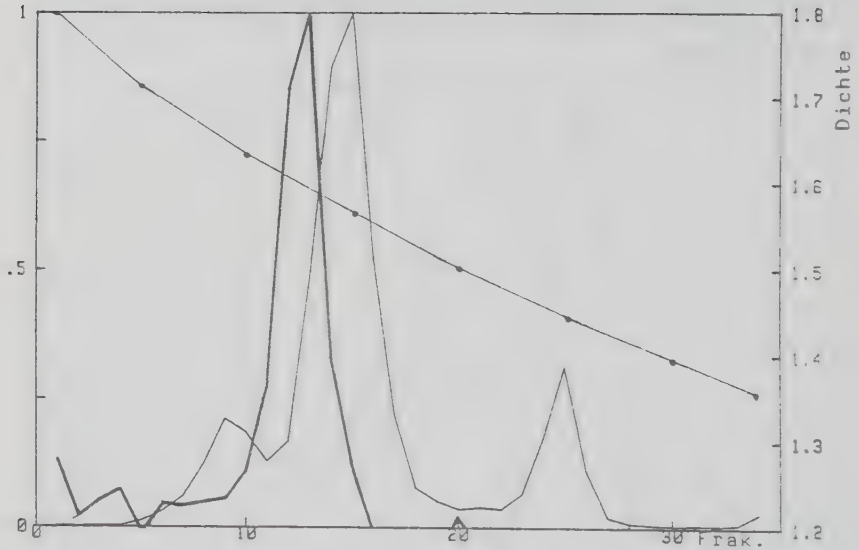

Abb. 48: Isopyknische Zentrifugation von S1-Nuclease-verdauten nonnascent pieces der Matrix-DNA (^{32}P-markiert) und einer Referenz-DNA (^{3}H-dThd-langzeitmarkiert) im Ag^+/Cs_2SO_4-Gradienten wie bei Abb. 9.
——— = ^{32}P-nonnascent pieces; cpm im Maximum: 701
——— = ^{3}H-Referenz-DNA; cpm im Maximum: 3662
•——• = Dichte

pieces sind einzelstrangige Moleküle, deren Sequenz hochrepetitiv ist (z.B. Satellit) und deren Dichte durch Ag^+-Komplexierung nicht so sehr erhöht wird wie die einzelsträngiger Gesamt-DNA. In diesen drei Fällen wäre das Erscheinen des Gipfels in einem Dichtebereich zwischen Einzel- und Doppelstrangbereich zu erwarten.

Die Behandlung der nonnascent pieces der Matrix-DNA mit Proteinase K (16 Std.), gefolgt von einer Phenolisierung in Anwesenheit von 3 M NaCl und 5 M Harnstoff müßte alle Proteine freisetzen, die nicht zu den „tightly bound proteins" gehören. Wie jedoch aus Abb. 49 ersichtlich ist, verschiebt sich der Gipfel nach einer derartigen Behandlung nicht.

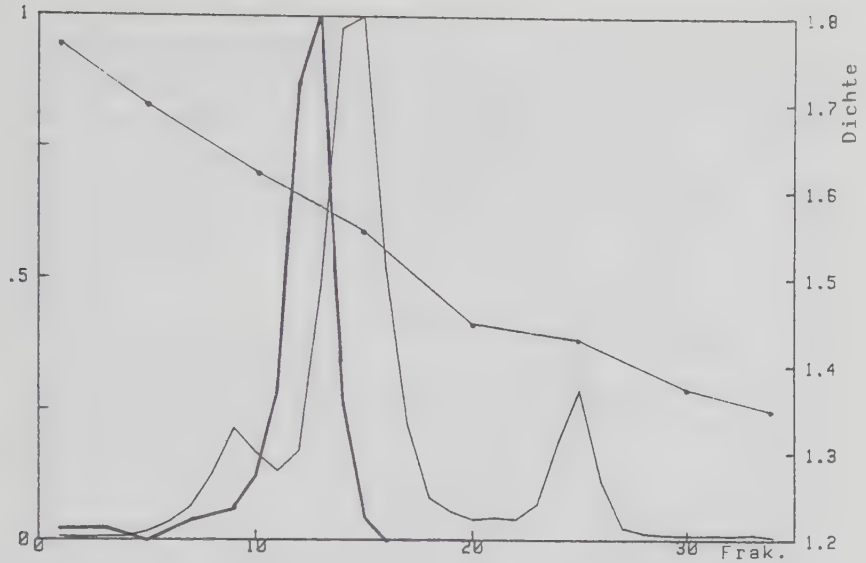

Abb. 49: Isopyknische Zentrifugation von nonnascent pieces der Matrix-DNA (^{32}P-markiert), die 16 Std. mit Proteinase K verdaut und anschließend in 3 M NaCl/5 M Harnstoff phenolisiert wurden, sowie einer Referenz-DNA (^{3}H-dThd-langzeitmarkiert) im Ag^+/Cs_2SO_4-Gradienten wie bei Abb. 9.
——— = ^{32}P-nonnascent pieces; cpm im Maximum: 774
——— = ^{3}H-Referenz-DNA. cpm im Maximum: 2786
—•— = Dichte

Endgültigen Aufschluß über die Existenz von RNA an den nonnascent pieces, etwa in der Form eines DNA-RNA-Hybrides oder in kovalenter Bindung ähnlich wie ein RNA-Primer, ergibt die Alkalibehandlung. Durch Inkubation der Probe mit 1 N NaOH bei 80°C für eine Stunde wird die DNA nicht angegriffen, während eine eventuell vorhandene RNA beseitigt und zu 2'- und 3'-Mononucleotiden hydrolysiert wird. DNA unterliegt nicht der alkalischen Hydrolyse, da sie keine 2'-OH-Gruppe hat und somit kein intermediär auftretendes cyclisches 2',3'-Phosphat ausbilden kann (153). Würde RNA aufgrund ihrer höheren Dichte die Position der nonnascent pieces im isopyknischen Gradienten zu höherer Dichte hin verschieben, so müßten diese nach Hydrolyse der RNA in Richtung auf geringere Dichte verschoben werden. Aus Abb. 50 erkennt man jedoch,

daß das nicht der Fall ist. Ein Teil der nonnascent pieces bandet wieder im Intermediärbereich zwischen Einzel- und Doppelsträngen; eine zusätzliche Bande tritt jedoch auf, die im Einzelstrangbereich lokalisiert ist.

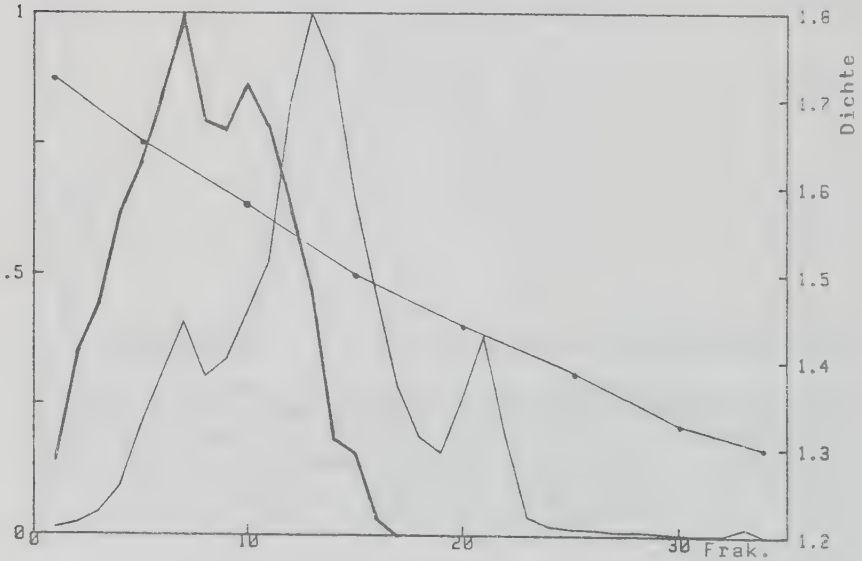

Abb. 50: Isopyknische Zentrifugation von nonnascent pieces der Matrix-DNA (^{32}P-markiert), die 1 Std. in 1 N NaOH bei 80°C inkubiert wurden, sowie einer Referenz-DNA (^{3}H-dThd-langzeitmarkiert) im Ag^+/Cs_2SO_4-Gradienten wie bei Abb. 9.
= ^{32}P-nonnascent pieces; cpm im Maximum: 478
= ^{3}H-Referenz-DNA; cpm im Maximum: 9224
= Dichte

Aufgrund der Peakbreite kann man folgern, daß das Molekulargewicht der Probe stark abgenommen hat, denn es besteht eine indirekte Proportionalität zwischen Molekulargewicht und Peakbreite. Die beiden Gipfel sind aufgrund der großen Breite stark überlappend, so daß sie nicht eindeutig voneinander abzugrenzen sind. Das Ergebnis der Alkalibehandlung ist mit der Existenz von Proteinen an den Stücken vereinbar. Diese werden durch NaOH vom DNA-Anteil der Stücke

abgetrennt, wodurch die Stücke im isopyknischen Gradienten an der Stelle erscheinen, wo Einzelstränge banden. Ferner verbleiben weitere (oder die gleichen) Proteine an den Stükken und verringern deren Dichte. Sollte dieses zutreffen, müßte ein alkalischer CsCl-Gradient Aufschluß darüber geben, denn dort wären zwei verschiedene Peaks (bei normaler und bei erniedrigter Dichte) zu erwarten (vgl. 3.3.8).

3.3.8 Untersuchung der nonnascent pieces auf fest gebundene Proteine

In einem alkalischen CsCl-Gradienten kommt es zu einer vollständigen Strangtrennung von Doppelstrang-DNA, so daß die nonnascent pieces in einzelsträngiger Form vorliegen, auch wenn sie zuvor Netzwerke gebildet haben. Sind in einem derartigen Gradienten die Stücke teilweise an Proteine gebunden, so müßten diese Stücke bei einer geringeren Dichte erscheinen.

Abb. 51 gibt das Ergebnis einer alkalischen CsCl-Gradientenzentrifugation wieder. Deutlich erkennbar ist das Erscheinen von zwei Peaks, die bei isopyknischer Zentrifugation im neutralen Gradienten nur als ein Gipfel dargestellt werden (Abb. 43). Eine derartige Aufspaltung in zwei Gipfel erhält man auch bei der isopyknischen Zentrifugation im alkalischen Gradienten von Satellit-DNA (103). Dort ist das Erscheinen der beiden Gipfel dadurch zu erklären, daß der eine der beiden Satellit-DNA-Stränge purinreich ist (und zwar der leichte beim Mäuse-Satelliten). Das würde bei den nonnascent pieces zu der Interpretation führen, daß es zwei Populationen gibt: solche, die purinreich sind, und solche, bei denen die Pyrimidine überwiegen.

Eine sehr empfindliche Methode, mit der man überprüfen kann, ob der festgestellte Dichteunterschied zwischen den beiden Peaks auf die Existenz von Proteinen oder auf das Vorhandensein von zwei Populationen der Stücke zurückzuführen ist,

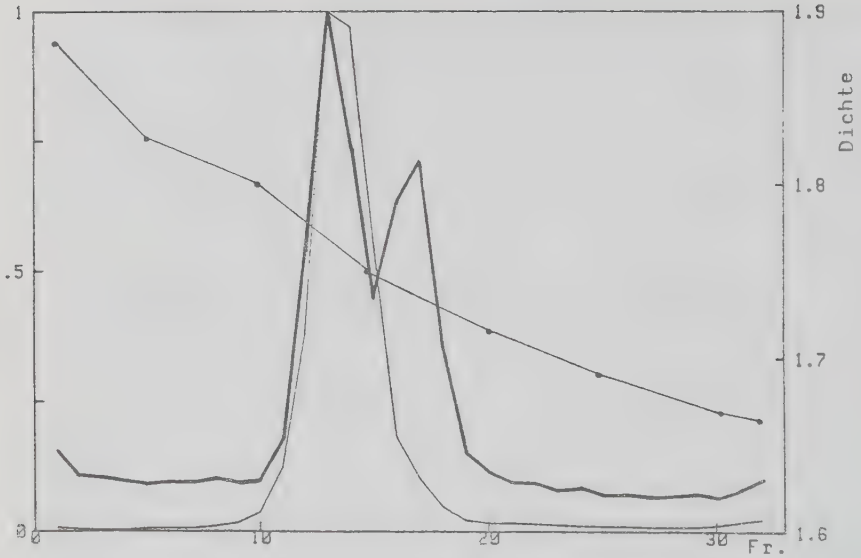

Abb. 51: Isopyknische Zentrifugation von nonnascent pieces der Matrix-DNA (^{32}P-markiert) und einer ^{14}C-Maus-DNA (^{14}C-dThd-langzeitmarkiert) im alkalischen CsCl-Gradienten. Die Proben in 1 mM EDTA, 0,1 N NaOH werden auf ein Gewicht von 5,97 g gebracht und mit 8,12 g CsCl versetzt. Zentrifugationsbedingungen: 50 Ti-Rotor, 43 000 rpm, 25°C, 36 Std.
= ^{32}P-nonnascent pieces; cpm im Maximum: 2838
= ^{14}C-Maus-DNA; cpm im Maximum: 10 426
= Dichte

ist die radioaktive Jodierung. Führt man die Proteinjodierung unter solchen Bedingungen durch, unter denen ausschließlich Proteine, nicht jedoch DNA markiert werden, so erhält man eine Markierung der nonnascent pieces nur bei Vorhandensein von Proteinen. Die unterschiedlich purinhaltigen Populationen sollten bei Proteinabwesenheit gar nicht jodiert werden; tritt dennoch eine Markierung auf, so sollte sie für beide Peaks einigermaßen gleichmäßig sein.

In Abb. 52 ist das Resultat eines derartigen Jodierungsversuches dargestellt. Die Jodierung wurde nach Plagens (74, 154) durchgeführt. Unter den von diesem Autor angegebenen Bedingungen werden ausschließlich Proteine radioaktiv mar-

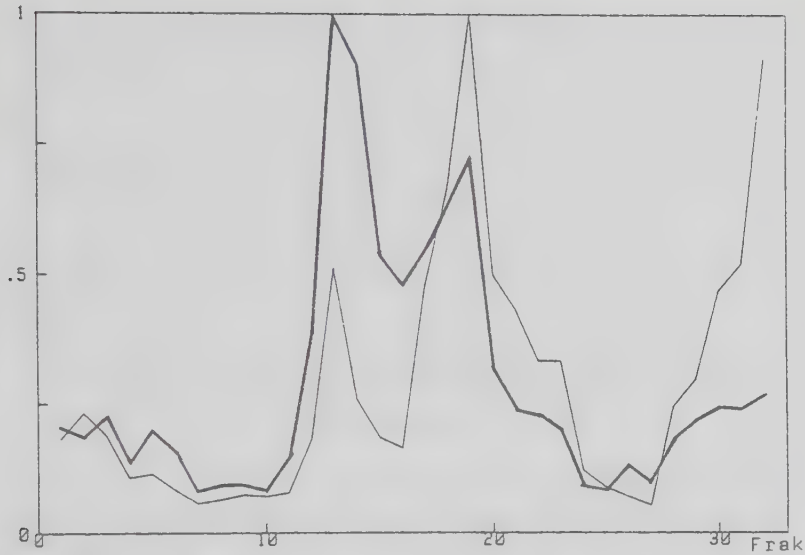

Abb. 52: Isopyknische Zentrifugation von nonnascent pieces der Matrix-DNA (^{32}P-markiert), die nach 2.2.6 jodiert wurden, analog Abb. 51.
——— = ^{32}P-Markierung der nonnascent pieces; cpm im Maximum: 6087
——— = ^{125}J-Markierung der nonnascent pieces; cpm im Maximum: 118 740

kiert. Man erkennt in Abb. 52, daß der leichtere Peak mit wesentlich mehr ^{125}J-Radioaktivität assoziiert ist; ferner tritt am Meniskus des Zentrifugenröhrchens ein weiterer Gipfel an ^{125}J-Radioaktivität auf. Das Ergebnis ist nur dadurch zu deuten, daß nonnascent pieces an Proteine gebunden sind. Unter den alkalischen Bedingungen des Gradienten werden von einem Teil der Stücke Proteine entfernt und erscheinen infolge ihrer geringen Dichte am Meniskus des Röhrchens. Diejenigen Stücke, die an diese Proteine gebunden waren, erscheinen bei höherer Dichte im Gradienten. Diejenigen, die noch an Proteine gebunden bleiben, banden bei geringerer Dichte.

Die Existenz von zwei Populationen von nonnascent pieces mit unterschiedlichem Purin-/Pyrimidingehalt kann die dargestellten Ergebnisse nicht erklären. Zwar spricht nichts dagegen, daß es verschiedene Populationen von Stücken geben kann (z.B. solche, die fester mit Proteinen assoziiert sind als andere), doch ist nicht zu erklären, wieso der leichtere Peak mit wesentlich mehr ^{125}J-Radioaktivität erscheint, falls nicht Proteine für den Dichteunterschied verantwortlich sind, sondern die Basenzusammensetzung der Stränge. Ferner ist auch nicht zu erklären, wieso am Meniskus so viel ^{125}J-Radioaktivität angesammelt ist, wenn die Zusammensetzung der Basen einen Einfluß auf die Jodierung ausüben sollte und der leichte Strang bevorzugt jodiert wird.

Um zu überprüfen, ob DNA unter den durchgeführten Bedingungen jodiert wird (wenn sie keine Proteine enthält!), wurde DNA aus λcI 857 Sam7 (Boehringer Mannheim) analog behandelt. Diese DNA ist absolut proteinfrei. Es fanden sich keine Anzeichen dafür, daß die DNA jodiert wurde, denn es war im alkalischen CsCl-Gradienten kein Peak zu beobachten (hier nicht dargestellt). Deshalb wird vermutet, daß der kleine ^{125}J-Peak beim DNA-Peak höherer Dichte nicht auf eine Jodierung des Polynucleotidstranges zurückzuführen ist, sondern auf die Existenz noch in geringer Menge vorhandener Proteine.

Bei der Diskussion der Assoziation von Proteinen an DNA unter Bedingungen, die eine Alkalibehandlung überstehen, ist von Bedeutung, ob derartige Beobachtungen bereits gemacht wurden. Bei Viren (155-157) sind sehr fest und kovalent gebundene Proteine an der DNA gefunden worden. Von den DNA-Topoisomerasen ist bekannt, daß sie über Phosphotyrosin-Verknüpfungen kovalente Bindungen mit der DNA eingehen (158). Werner hat festgestellt, daß die DNA aus Ehrlich-Ascites-Tumorzellen alkali-stabile Bindungen mit Proteinen eingeht (132, 133, 154). Da gezeigt wurde, daß DNA an der

Matrixbindungsstelle mit Proteinen in sehr fester Bindung verknüpft ist (62, 63), erscheint es möglich, daß die nonnascent pieces der Matrix-DNA unmittelbar an der Anheftung der DNA an die Matrix beteiligt sind. Somit kann man spekulieren, daß die Funktion der nonnascent pieces in der Herstellung der Matrix-DNA-Bindung bestehen könnte. Allerdings ist diese Spekulation in keiner Weise belegt, da über die biologische Rolle der nonnascent pieces bisher nur Vermutungen bestehen.

3.3.9 Filterhybridisierung der nonnascent pieces mit Matrix-DNA

Vermutet man als eine der möglichen Funktionen der nonnascent pieces die Vermittlung der Bindung von DNA an die Kernmatrix, so sollte überprüft werden, ob diese Stücke überall an der DNA vorkommen. Eine Möglichkeit, um dieses zu überprüfen, besteht in der Durchführung einer Filterhybridisierung mit Matrix-DNA, die im Ag^+/Cs_2SO_4-Gradienten aufgetrennt wurde. Bei dieser Trennung wird durch die unterschiedlich starke Silberbindung an einzelne Komponenten der DNA eine Auflösung erhalten, die durch eine isopyknische Zentrifugation in Abwesenheit von Silber nicht zu erreichen ist (vgl. Abb. 6-11).

Nach Immobilisierung der Matrix-DNA einzelner Fraktionen einer Ag^+/Cs_2SO_4-Zentrifugation auf Nitrocellulosefiltern (2.2.22) werden ^{32}P-markierte nonnascent pieces mit den Filtern hybridisiert. Aufgrund der Verteilung der ^{32}P-Radioaktivität auf die einzelnen Fraktionen kann man beurteilen, ob die nonnascent pieces entlang der gesamten DNA vorkommen. Nur in diesem Fall ist eine ubiquitäre Hybridisierung zu erwarten.

Abb. 53 gibt einen solchen Filterhybridisierungsversuch mit nonnascent pieces sowie S1-Nuclease-verdauten nonnascent pieces der Matrix-DNA wieder. Aufgrund des erhaltenen Profils kann geschlossen werden, daß die Stücke mit DNA-Fragmen-

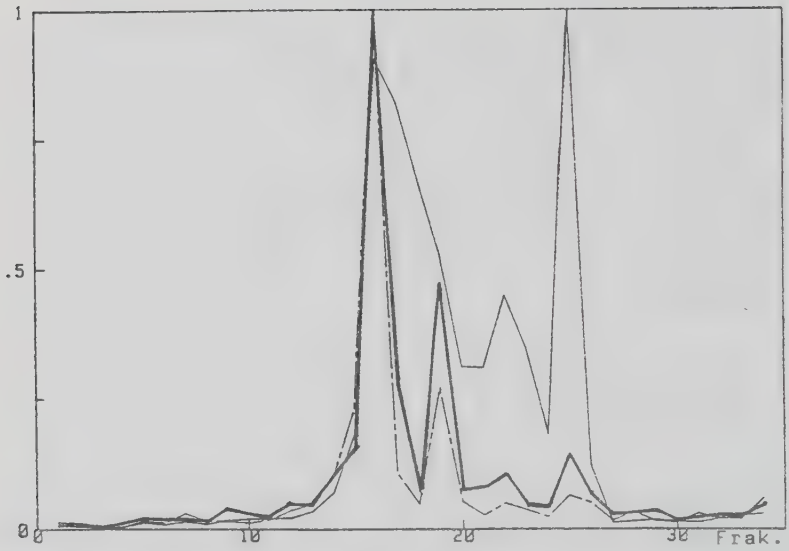

Abb. 53: Filterhybridisierung von unbehandelten und S1-Nuclease-verdauten nonnascent pieces der Matrix-DNA (^{32}P-markiert) mit ^{3}H-dThd-langzeitmarkierter Matrix-DNA, die in einem Ag^{+}/Cs_2SO_4-Gradienten aufgetrennt und fraktioniert worden war.
——— = ^{32}P-nonnascent pieces; cpm im Maximum: 1574
— - — - = ^{32}P-S1-Nuclease-verdaute nonnascent pieces; cpm im Maximum: 1082
——— = ^{3}H-Matrix-DNA; cpm im Maximum: 1617

ten der unterschiedlichsten Dichten hybridisieren. Zu beachten ist, daß die aufgetragene Radioaktivitätsmenge zu gering ist, um ein aussagekräftigeres Ergebnis zu erhalten. In analogen Filterhybridisierungsexperimenten, die in der Gentechnologie durchgeführt werden, bringt man in der Regel 10^6 - 10^8 cpm ^{32}P-markierter Probe zur Hybridisation. Aufgrund der geringen Menge und Größe der nonnascent pieces ist eine derartig hohe ^{32}P-Markierung nicht erreichbar, es sei denn, man führt extrem große Versuchsansätze durch. Daher ist es auch möglich, daß die Abnahme der Hybridisierung in Fraktionen 17 und 18 aus Abb. 53 auf ein Artefakt zurückzuführen ist, der sich durch die geringe Menge aufge-

tragener Radioaktivität erklärt. Jedenfalls gibt es keinen Anhaltspunkt dafür, daß nonnascent pieces nur mit einzelnen Bereichen der DNA (z.B. dem Satellitanteil) hybridisieren.

3.4 Abschließende Diskussion

Der gegenwärtige Kenntnisstand über die Wechselwirkungen von Nucleinsäuren mit Proteinen ist noch sehr beschränkt, obwohl sie auf allen Ebenen der DNA-Replikation und Genexpression sowie bei vielen regulatorischen Prozessen in Erscheinung treten. Einzelheiten bezüglich der Selektivität der Aminosäuren-tRNA-Synthetasen für ihre jeweiligen tRNAs sind nicht bekannt. Auch weiß man nicht, wie Restriktionsendonucleasen im einzelnen an die DNA binden und an ganz bestimmten Stellen das Molekül durchschneiden. Lediglich in wenigen Fällen wurden spezifische Nucleinsäuren-Protein-Komplexe in Kristallform erhalten, die eine Röntgenbeugungsanalyse ermöglichen: Komplexe der DNA mit der Restriktionsendonuclease Eco RI (159) und einem entwindenden Protein (160) sowie der Hefe-Aspartat-tRNA mit ihrer Aminosäure-tRNA-Synthetase (161) konnten genauer charakterisiert werden.

Anhand von Modellsystemen war es möglich, die Geometrie von spezifischen Nucleotid-Aminosäuren-Wechselwirkungen aufzuklären. Dabei kommt es zu Wechselwirkungen zwischen Basen und Carbonsäuregruppen (162), Wasserstoffbrücken-Wechselwirkungen mit Indol-NH (163), Stacking zwischen Base und aromatischen Aminosäurenseitenketten (164), Basen-Peptid-Wechselwirkungen (165), Salzbrücken zwischen Phosphat- und primären Ammonium- und Guanidingruppen (166) sowie zu kovalenten Bindungen zwischen Nucleinsäuren und Proteinkonstituenten (167, 168).

Im Hinblick auf die Wechselwirkung der DNA mit der vorwiegend hydrophoben Kernmatrix sind die Ergebnisse von Bedeu-

tung, die bei der Untersuchung der Wechselwirkung von DNA und einzelsträngigen Polynucleotiden mit den aromatischen Aminosäurenseitenketten gewonnen wurden. Dazu wurden Modell-Di- und Tripeptide verwendet, um erste Einblicke zu gewinnen. Die Wechselwirkung mit einzelsträngigen Polynucleotiden erfolgt vor allem über geladene terminale Gruppen und Stacking von aromatischen Aminosäurenseitenketten mit Basen. Die Assoziationskonstanten für poly(A) nehmen in der Reihe Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin ab (169). Bei doppelsträngiger DNA weist die Komplexbildung mit aromatischen Aminosäurenseitenketten Selektivität auf. Eine schnelle und starke elektrostatische Bindung (K_{ass} ca. 10^5 Mol/l) wird durch eine langsame und schwächere Interkalation (K_{ass} ca. 10^2 Mol/l) der aromatischen Seitenkette zwischen Basenpaare gefolgt (170). Da diese Interkalation jedoch nicht komplett, sondern teilweise erfolgt, tritt ein Bending der Doppelhelix auf (171). Bei diesem Vorgang ist eine Bevorzugung von AT-Basenpaaren zu beobachten, wohl aufgrund der Tatsache, daß bei ihnen das Stacking schwächer als bei GC-Basenpaaren ist. Erstaunlich ist, daß durch den hier beschriebenen Prozeß der T_m-Wert der DNA erhöht wird. Als Erklärung kann man anführen, daß das energetisch ungünstige Kinking (das den T_m-Wert erniedrigt) durch Wechselwirkungen der Ladungen von Phosphaten und positiv geladenen Aminosäurenseitenketten überkompensiert wird.

Bei Enzymen sind die Wechselwirkungen bestimmter Teile des Proteins (z.B. des aktiven Zentrums) mit dem umzusetzenden Substrat genauer untersucht worden. Dabei konnte man feststellen, daß es eine Vielzahl von Möglichkeiten für Nucleotid-/Nucleinsäure-Wechselwirkungen mit Proteinen gibt. Bei der NADPH-abhängigen Dihydrofolat-Reductase (172) spielen spezifische und unspezifische hydrophobe Taschen eine Rolle, in der Staphylococcus-Nuclease (173) sind die enge Bindung an Phosphate und eine unspezifische hydrophobe Rinne

von Bedeutung, während in der Pankreas-RNase S (174) die Bindung an Phosphate nur schwach erfolgt. Mittels Haupt- und Seitenketten-Wechselwirkungen in der Ribonuclease T_1 wird eine spezifische Erkennung von Guanin gewährleistet.

Schließlich soll noch erwähnt werden, daß bis Anfang 1984 fünf verschiedene DNA-bindende Proteine durch Röntgenbeugungsanalyse in ihrer räumlichen Struktur charakterisiert werden konnten: Netropsin, ein Oligopeptid, bindet besonders an AT-reiche Abschnitte der B-DNA (175); der cro-Repressor bindet über α-Helix- und ß-Faltblattstrukturen an B-DNA (176); die Bindung des λ-Repressors weist große strukturelle Ähnlichkeiten mit der des cro-Repressors auf (177); durch Bindung des Catabolit-Gen-Aktivator-Proteins (CAP) über die α-Helices an B-DNA scheint eine Konformationsumkehr der rechts- in die linkshändige Doppelhelix in der DNA bewirkt zu werden (178); das Gen 5-Produkt des fd-Phagen, ein Entwindungsprotein, bindet kooperativ an Einzelstrang-DNA (179).

Die DNA geht auf verschiedenen Stufen ihrer strukturellen Organisation im Zellkern Wechselwirkungen mit Proteinen ein, und zwar (a) beim Packen der DNA durch Histone in Nucleosomeinheiten, (b) beim Packen der Nucleosomen in eine Chromatinfaser oder ein Solenoid, (c) bei der strukturellen Organisation der Fasern in DNA-Loop-Domänen, die an ihrer Basis an der Kernmatrix verankert sind, und (d) bei der Kondensation in Chromosomen während Pro- und Metaphase zur anschließenden Trennung in der Anaphase (180). Die DNA-Doppelhelix wird schließlich auf eine Achsenlänge reduziert, die 1/8000 ihrer ursprünglicher Länge in entspannter Form entspricht. Die unterschiedlichen DNA-Struktur-Ordnungen sind in Tabelle 13 wiedergegeben.

Die Struktur des Chromatins ist ausführlich untersucht worden; ein Überblick findet sich in (181). Sehr wenig bekannt

Tabelle 13

DNA-Struktur-Ordnungen. Verändert nach (180).

Struktur (Einheit)	Anzahl Basenpaare	Maße	Packungsverhältnis	Verflechtungsgrad	Anzahl Nucleosomen
Doppelhelix (1 Windung)	10,4	3,2 nm Höhe 2,0 nm ø	1	+ 1	-
Nucleosom - H1 + H1	 146 166	11·11·5,5 nm	~5	 -1,75 -2	1
Fibrille (Core + Linker)	200	10 nm ø	~5-7	?	1
Cromatinfaser (1 Windung)	~1200	10 nm Höhe 30 nm ø	~40	~6	~6
Gen (Intron,Exon)	~1000-10000	?	?	?	~50
Loop - Histone + Histone	 30000-100000	 10-30 µm* 0,2-1,0 µm*	 100-500	 ~150-500	 0 ~150-500
Metaphasechromatid	0,5-2,4 $\cdot 10^8$	1-10 µm Länge 0,5 µm ø	8000-10000	?	~0,25-1·10^6
Interphasekern	7·10^9	10 µm ø	?	?	~3,5·10^7

* Konturlänge

ist bisher über die Anheftung der DNA-Loops an die Kernmatrix, welche Nichthiston-Proteine enthält. Die DNA-Loops scheinen eine wichtige Rolle bei der Replikation zu spielen, da einzene Loops als Einheiten repliziert werden und Replikons entsprechen. Die Länge der Loops reicht aus, um große Gen-Cluster zu umfassen. DNA derselben Länge wie Loops scheint während der Genaktivierung bevorzugt DNase I-sensitiv zu wer-

den (180). Daher ist anzunehmen, daß Loops wichtige funktionelle Einheiten bei der Replikation und Transkription darstellen.

Neben den Matrixbindungen, welche die DNA bei der Replikation eingeht (14, 15, 92), gibt es solche, die während des gesamten Zellzyklus bestehen bleiben und die strukturellordnende Funktionen haben. Diesen Bindungen nichtreplizierender DNA an die Matrix galt die besondere Aufmerksamkeit dieser Arbeit. Geht man davon aus, daß die Anheftung stabil ist und nicht ständigen Schwankungen unterliegt, so ist die Postulierung einer strukturellen Besonderheit seitens der DNA gerechtfertigt.

Kowalski und Denhardt (66) demonstrierten die Existenz von nonnascent pieces einer Länge von weniger als 100 Nucleotiden in Eukaryonten-DNA. Die Funktion dieser Stücke konnte nicht ermittelt werden, verschiedene Möglichkeiten wurden jedoch angeführt (66, 182): Sie könnten eine Rolle bei der Initiation der DNA-Synthese an Replikon-Origins spielen, sowie durch Insertion in die DNA-Doppelhelix (mit Exponierung einzelsträngiger DNA) bei Vorgängen wie Transposition, Amplifikation, Rekombination oder Reparatur. Probst et al. (64) führten eine weitere mögliche Funktion für nonnascent pieces auf: die Vermittlung oder zumindest Beteiligung bei der Anheftung der DNA an die Kernmatrix.

Nonnascent pieces, die eventuell in „displacement loops" in der DNA vorkommen können (66), wurden in Nitrocellulosebindender DNA in zehnfach höherem Überschuß gefunden verglichen mit nichtbindender DNA (64). Der Anteil von 3% Nitrocellulose-bindender DNA, die von Probst gefunden und in dieser Arbeit bestätigt wurde, korreliert sehr gut mit den ca. 2,5-3% Matrix-DNA, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde. Bei der Matrix-DNA beträgt die Anreicherung der nonnascent pieces ca. 10-20mal, wenn man die Größenun-

terschiede zu den Stücken der Überstand-DNA mit berücksichtigt (3.3.6). Dieser Wert entspricht höchstwahrscheinlich der 10fachen Anreicherung in der Nitrocellulose-bindenden DNA, die von Probst gefunden wurde.

Liegen die nonnascent pieces in „displacement loops" vor, so sollte man von solch einer Struktur zweierlei erwarten: (a) Einzelstrangbereiche sollten vorhanden sein, die durch S1-Nuclease abbaubar sind; (b) tritt nach Verdau mit S1-Nuclease eine (Rest-) Bindung an Nitrocellulose auf, so sollte diese durch Proteine verursacht werden, die in der Nähe der „displacement loops" lokalisiert sind, z.B. an den nonnascent pieces. Beide Punkte treffen zu, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte.

Einzelstrangbereiche haben eine große Affinität zu den hydrophoben Matrix-Proteinen (11O) und würden eine Anheftungsstruktur der DNA an die Matrix stabilisieren. Während Überstand-DNA nur zu ca. 1% an Nitrocellulose bindet, wird Matrix-DNA zu 22-23% (in kryolysierter Form zu 7-10%) gebunden. Nach Verdau mit S1-Nuclease verringert sich dieser Wert auf ca. 3-4% bei kryolysierter und nicht-kryolysierter Matrix-DNA. Normiert man die Bindung auf gleiches mittleres Molekulargewicht, so weist die Matrix-DNA eine vierfach so hohe Bindung wie Überstand-DNA auf. Der Abstand zwischen zwei Nitrocellulose-Bindungspunkten ist für Überstand-DNA achtmal so groß wie für Matrix-DNA. Aufgrund des äußerst geringen Anteils an Einzelstrang-DNA ist man auf den Nitrocellulose-Bindungstest zum Nachweis angewiesen.

Daß die Nitrocellulosebindung der Matrix-DNA nach Verdau mit Einzelstrang-spezifischer Nuclease nicht auf den Hintergrundwert zu bringen ist, kann man auf die Proteine zurückführen, die mit den nonnascent pieces verbunden sind. Ob weitere Proteine in der DNA außerhalb der „displacement loops" (d.h. nicht mit den nonnascent pieces gebunden) vorkommen, kann aufgrund der vorliegenden Daten nicht entschieden werden.

Der geringe $c_0t_{1/2}$-Wert der Matrix-DNA-nonnascent pieces (Abb. 31) ist wahrscheinlich auf den hohen Repetitionsgrad der Sequenzen der Stücke zurückzuführen. Die zweite Erklärungsmöglichkeit ist das Vorliegen von inverted repeats. Allerdings macht die geringe Größe der Stücke (ca. 50 Nucleotide) diese Möglichkeit unwahrscheinlich: mindestens 30 Basenpaare müssen vorliegen, damit eine Bindung an Hydroxyapatit zustandekommt (124). Durch Anwendung der hochauflösenden Elektronenmikroskopie müßte entschieden werden können, ob Haarnadel-Strukturen (hair-pins) bei den nonnascent pieces vorkommen. Die scharfen Banden in isopyknischen Gradienten sind aller Wahrscheinlichkeit nach auf die Ausbildung großer Netzwerke zurückzuführen, die durch die große Reassoziationsfreudigkeit der Stücke entstehen.

Da die nonnascent pieces der Überstand-DNA nicht schnell reassoziierend sind, kann man bei den kleinen Stücken zwei Klassen unterscheiden: Die einen (aus der Matrix-DNA) sind wahrscheinlich für die Verankerung der DNA-Loops an die Matrix verantwortlich; die anderen (aus der Überstand-DNA) nehmen vermutlich andere Funktionen wahr. Cook und Lang (92) zeigten jüngst, daß bei der Anheftung bestimmter Loop-Teile an die Matrix, die normalerweise nicht matrixgebunden sind, die Replikation initiiert wird. Da in (66) vermutet wird, daß nonnascent pieces an der Replikon-Initiation beteiligt sind, bietet sich der Gedanke an, daß die schnell reassoziierenden nonnascent pieces der Matrix-DNA für die ständige Verankerung an die Matrix verantwortlich sind und die langsam reassoziierenden nonnascent pieces der Überstand-DNA für kurzfristige oder passagere wie bei der DNA-Replikation. Allerdings ist dieses experimentell nicht gezeigt worden.

Bei der hohen Anfangsbindung von nonnascent pieces der Matrix-DNA an Hydroxyapatit bei der Aufnahme einer c_0t-Kurve muß der Proteinanteil berücksichtigt werden. Während

Nicht-Phosphoproteine nicht an den Säulenträger binden dürften, könnte eine (starke) Bindung durch die Existenz von Phosphoproteinen an den Stücken zu erklären sein. Daher müßte es eines der vorrangigsten Ziele bei sich anschließenden Untersuchungen sein, die Proteine an den Stücken näher zu charakterisieren. Es müßte überprüft werden, ob es sich bei den Proteinen um eines der beiden von Werner (133) charakterisierten Ehrlich-Ascites-Proteine der „tightly bound"-Klasse handelt, die ein Molekulargewicht von 54 000 D bzw. 68 000 D haben. Es ist auch zu klären, ob es sich nur um ein Protein handelt, das in Alkali teilweise von den DNA-Stücken abgespalten wird und teilweise nicht (vgl. Abb. 51 und 52), oder um (zwei) verschiedene mit unterschiedlicher Alkalistabilität. Die Molekulargewichtsbestimmung müßte Aufklärung darüber geben, ob die Proteine zu den drei Haupt-Matrix-Proteinen im Molekulargewichtsbereich 60 000 - 70 000 D gehören (6).

Nonnascent pieces in Bakterien enthalten vermutlich keine fest gebundenen Proteine (183). Würde eine Untersuchung bei anderen Eukaryonten-DNAs ergeben, daß nonnascent pieces (zumindest teilweise) an Proteine gebunden sind, so würde das ihre vermutete Funktion als Verankerungsvermittler bestärken; Matrices gibt es nur bei Eukaryonten, nicht jedoch bei Bakterien. Kurze Stücke könnten im Laufe der Evolution wenigstens als eine Funktion die Aufgabe übernommen haben, die DNA in Loop-Domänen zu ordnen.

Die Tatsache, daß Matrix-DNA-nonnascent pieces sehr fest an Proteine gebunden sind, mag als Anzeichen dafür dienen, daß die Bindung zwischen DNA und Kernmatrix sehr stabil ist und ferner über längere Zeit aufrechterhalten wird. Wäre die DNA nur lose mit Proteinen an der Verankerungsstelle verbunden, könnte man spekulieren, daß ständig andere DNA-Abschnitte matrixgebunden sind. Es scheint jedoch für nichtreplizierende DNA eine gewisse Fixierung zu existieren (59).

Wird als möglich angenommen, daß „displacement loop"-Strukturen, welche nonnascent pieces enthalten, die tatsächlichen Anheftungsstrukturen der DNA an die Kernmatrix darstellen, so sollte die Anzahl der nonnascent pieces mit der Anzahl der Loop-Anheftungsstellen übereinstimmen. Daß das tatsächlich auch zutrifft, zeigt die folgende Rechnung:

Ein Maus-Zellkern enthält in Ehrlich-Ascites-Tumorzellen $14 \cdot 10^{-12}$ g DNA (87), was $8{,}38 \cdot 10^{12}$ D entspricht. Da an der Matrix ca. 2,6% DNA verbleiben und die 55°C-Fraktion 1,22% hiervon ausmacht, entspricht das einem Molekulargewicht von $2{,}76 \cdot 10^{9}$ D. Dieser Wert ist gleich dem Gesamtgewicht matrixgebundener nonnascent pieces. Nimmt man für die durchschnittliche Länge der nonnascent pieces der Matrix-DNA den Wert von 50 Nucleotiden an, so entspricht das einem Molekulargewicht von 20 000 D. Die Anzahl der nonnascent pieces ergibt sich somit zu 138 000. Dividiert man nun die $8{,}38 \cdot 10^{12}$ D durch die Anzahl der nonnascent pieces, so erhält man einen Wert von $6{,}07 \cdot 10^{7}$ D, was 90 000 Basenpaaren entspricht.

Die Rechnung ergibt, daß pro Loop 90 000 Basenpaare enthalten sind. Ein Vergleich mit Tabelle 14 ergibt, daß unser Zahlenwert sehr gut mit den Werten aus der Literatur übereinstimmt.

Geht man von einer Anzahl von ca. 138 000 nonnascent pieces in der Matrix-DNA aus und einer 10-20fachen Anreicherung in der Matrix-DNA gegenüber der Überstand-DNA (3.3.6), so erhält man eine Gesamtzahl von ca. 480 000 nonnascent pieces pro Zellkern in Ehrlich-Ascites-Zellen. Probst (64) berechnete eine Menge von 300 000 - 500 000; somit konnten die Ergebnisse von Probst bestätigt werden.

Treten an der Verankerungsstelle von DNA an die Kernmatrix Einzelstrangbereiche auf, so besteht die Möglichkeit, daß

Tabelle 14

Loop-Länge in Interphasenkern-DNA

Zellen	Loop-Länge (kbp)	Bestimmungs-methode	Literatur
Ehrlich-Ascites (Maus)	90	Berechnung (s. Text)	diese Arbeit
3T3 (Maus)	90	Größe des DNA-Halos	(17)
F 815 (Maus)	10 - 180	Elektronenmikroskopie	(49)
L (Maus)	62	Länge und Menge gebundener DNA	(59)
Rattenleber	34 - 75	Länge Nuclease-freigesetzter Fragmente	(58)
Rattenleber	80	Länge und Menge gebundener DNA	(19)
Rinderleber	140	Länge Nuclease-freigesetzter Fragmente	(57)
Hamster	140	Sedimentation, Röntgenstrahlenbrüche	(184)
Drosophila	85	Sedimentation, Interkalation	(195)
Saccharomyces cerevisiae	150 - 300	Sedimentation, Interkalation	(196)

diese nicht in vivo matrixassoziiert sind, sondern während der Isolierung an die Matrix adsorbieren. Es gibt zwei verschiedene Möglichkeiten: (a) DNA wird während der Matrixisolierung von den Kernen losgelöst und adsorbiert an andere Matrices; (b) DNA wird während der Matrixisolierung an Komponenten in der eigenen Matrix adsorbiert. Vogelstein et al. (187) konnten jedoch zeigen, daß Einzelstrang-DNA während der Isolierung nicht von der Matrix gebunden wird. Findet man demnach Einzelstrangbereiche an der Matrix, so ist zu vermuten, daß sie dem in vivo-Zustand entsprechen.

Folgendes Modell (H. Probst, persönliche Mitteilung) könnte eventuell die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen erklären (Abb. 54): Auf der DNA finden sich „displacement loop"-ähnliche Strukturen, die durch folgende Merkmale charakterisiert werden können:

(a) geclusterte repetitive Sequenzen kommen vor;
(b) Loops entstehen durch Verschiebung;
(c) eine Stabilisierung wird durch die in der Struktur enthaltenen nonnascent pieces erreicht. Eventuell sind diese mit Proteinen assoziiert.

Es ist durchaus möglich, daß mehrere „displacement loop"-Strukturen pro Anheftungsstelle vorkommen. Die Klärung über nähere Einzelheiten bleibt zukünftigen Untersuchungen vorbehalten.

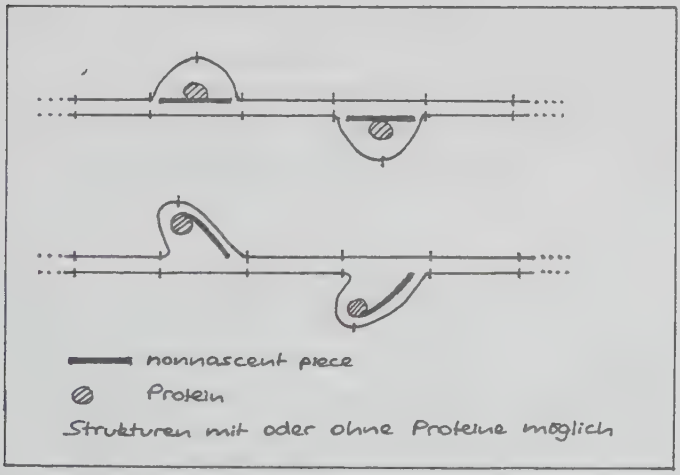

Abb. 54: Modell (nach Probst) der DNA-Strukturen, die für die Bindung an die Kernmatrix verantwortlich sind. Erläuterungen im Text.

4 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, strukturelle Besonderheiten der DNA an den Kernmatrix-Verankerungsstellen zu finden. Dazu wurden Ehrlich-Ascites-Tumorzellkerne mit der Restriktionsendonuclease Eco RI verdaut, die Matrix isoliert, die an sie gebundenen DNA-Fragmente gereinigt und auf Besonderheiten hin überprüft.

Einzelstranganteile in der matrixassoziierten DNA konnten mittels isopyknischer Zentrifugation und Hydroxyapatit-Chromatographie nicht gefunden werden. Die empfindlichere Nitrocellulose-Chromatographie ergab hingegen eine 19fach (14fach) stärkere Bindung langzeitmarkierter (4 min-pulsmarkierter) matrixassoziierter DNA im Vergleich zur nicht-matrixassoziierten DNA, ermittelt durch die Menge nitrocellulosegebundener Radioaktivität. Nach stochastischer Fragmentierung der Matrix-DNA-Fragmente mittels Kryolyse wiesen diese eine 7-fach höhere Nitrocellulosebindung auf als nicht-matrixassoziierte Fragmente. Die Nitrocellulosebindung verschwindet nach Verdau mit Einzelstrang-spezifischer Nuclease zum größten Teil.

Kurze einzelsträngige, aus helikaler DNA herausschmelzbare Stücke („nonnascent pieces") sind in der Matrix-DNA-Fraktion 10-20mal angereichert. Ihre Größe beträgt ca. 50 Nucleotide in der Matrix-DNA-Fraktion und ca. 300 Nucleotide in der Nichtmatrix-DNA-Fraktion. Nonnascent pieces der Matrix-DNA sind sehr schnell reassoziierend (ca. 50% Reassoziation bei c_0t-Wert von 10^{-3}) und bilden hochmolekulare Netzwerke. Die entsprechenden Stücke der Nichtmatrix-DNA reassoziieren hingegen langsam (ca. 5% Reassoziation bei c_0t-Wert von 10^2). Im isopyknischen Cs_2SO_4-Gradienten, der Ag^+-Ionen zur Vergrößerung der Dichteunterschiede enthält, banden die nonnascent pieces der Nichtmatrix-DNA im Einzelstrangbereich,

diejenigen von Matrix-DNA hingegen zwischen Einzel- und Doppelstrangbereich. Durch Proteinase K- oder S1-Nuclease-Behandlung verändert sich die Position im Ag^+/Cs_2SO_4-Gradienten nicht, nach Alkalibehandlung tritt ein Gipfel im Einzelstrangbereich auf. Im isopyknischen alkalischen CsCl-Gradienten findet man zwei Gipfel. Bei Jodierung unter Bedingungen, die für Proteine spezifisch sind, tritt die Hauptmenge der Jodmarkierung an der leichten Bande auf.

Matrixassoziierte DNA-Fragmente sind an replikativen Strukturen („Okazaki-Stücken") angereichert. Der Anteil der Markierung replizierender DNA (22% bei 4 min-Puls) an der Kernmatrix ist größer als derjenige langzeitmarkierter DNA (2,6% bei 20 Std.-Markierung).

Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse stehen in Einklang mit einem Modell, in dem „displacement loop"-ähnliche Strukturen, welche Einzelstrangbereiche und nonnascent pieces enthalten, an der Verankerung der DNA an die Kernmatrix beteiligt sind.

5 LITERATUR

(1) Shaper,J.H., Pardoll,D.M., Kaufmann,S.H., Barrack,E.R., Vogelstein,B., Coffey,D.S. (1978) Adv. Enzyme Reg. 17, 213-248
(2) Mueller,G.C., Kajiwara,K. (1966) Biochim. Biophys. Acta 114, 1089-1115
(3) Taylor,J.H. (1960) J. Biophys. Biochem. Cytol. 7, 455-464
(4) Dingman,C.W. (1974) J. Theor. Biol. 43, 187-195
(5) Berezney,R., Coffey,D.S. (1974) Biochem. Biophys. Res. Comm. 60, 1410-1417
(6) Agutter,P.S., Richardson,J.C.W. (1980) J. Cell Sci. 44, 395-435
(7) Berezney,R. (1979) in: The Cell Nucleus (Busch,H.,ed.) 7, 413-456
(8) Kaufmann,S.H., Coffey,D.S., Shaper,J.H. (1981) Exp. Cell Res. 132, 105-123
(9) Herzog,R. (1981) Biochemische Diplomarbeit, Universität Tübingen
(10) Müller,M., Spiess,E., Werner,D. (1983) Eur. J. Cell Biol. 31, 158-166
(11) Berezney,R., Coffey,D.S. (1975) Science 189, 291-293
(12) Berezney,R., Coffey,D.S. (1976) Adv. Enzyme Reg. 14, 63-100
(13) Dvorkin,V.M.,Vanyushin,B.F. (1978) Biochemistry (URSS) 43, 1297-1301
(14) Dijkwel,P.A., Mullenders,L.H.F., Wanka,F. (1979) Nucleic Acids Res. 6, 219-230
(15) McCready,S.J., Godwin,J., Mason,D.W., Brazell,I.A., Cook,P.R. (1980) J. Cell Sci. 46, 365-386
(16) Pardoll,D.M., Vogelstein,B., Coffey,D.S. (1980) Cell 19, 527-536
(17) Vogelstein,B., Pardoll,D.M., Coffey,D.S. (1981) Cell 22, 79-85
(18) Hunt,B.F., Vogelstein,B. (1981) Nucleic Acids Res. 9, 349-363
(19) Berezney,R., Buchholtz,L.A. (1981) Exp. Cell Res. 132, 1-13
(20) Berezney,R., Buchholtz,L.A. (1981) Biochemistry 20, 4995-5002
(21) Smith,H.C., Berezney,R. (1980) Biochem. Biophys. Res. Comm. 97, 1541-1547
(22) Nelkin,B.D., Pardoll,D.M., Vogelstein,B. (1980) Nucleic Acids Res. 8, 5623-5634
(23) Robinson,S.I., Nelkin,B.D., Vogelstein,B. (1982) Cell 28, 99-106
(24) Berezney,R., Coffey,D.S. (1977) J. Cell Biol. 73, 616-637
(25) Berezney,R. (1980) J. Cell Biol. 85, 641-650
(26) Miller,T.E., Huang,C.-Y., Pogo,A.O. (1978) J. Cell Biol. 76, 675-691

(27) Steele,W.J., Busch,H. (1966) Biochim. Biophys. Acta 129, 54-67
(28) Pogo,A.O. (1981) in: The Cell Nucleus (Busch,H.,ed.) 8, 331-367
(29) Miller,T.E., Huang,C.-Y., Pogo,A.O. (1978) J. Cell Biol. 76, 692-704
(30) Hermann,R., Weymouth,L., Penman,S. (1978) J. Cell Biol. 78, 663-674
(31) Long,B.H., Huang,C.-Y., Pogo,A.O. (1979) Cell 18, 1079-1090
(32) van Eekelen,C.A.G., van Venrooij,W.J. (1981) J. Cell Biol. 88, 554-563
(33) Jackson,D.A., McCready,S.J., Cook,P.R. (1981) Nature 292, 552-555
(34) Mariman,E.C.M., van Eekelen,C.A.G., Reinders,R.J., Berns,A.J.M., van Venrooij,W.J. (1982) J. Mol. Biol. 154, 103-119
(35) Ross,D.A. (1980) Fed. Proc. 39, 2196
(36) Ciejek,E.M., Nordstrom,J.L., Tsai,M.-J., O'Malley,B.W. (1982) Biochemistry 21, 4945-4953
(37) Deppert,W. (1978) J. Virol. 26, 165-178
(38) Buckler-White,A.J., Humphrey,G.W., Pigiet,V. (1980) Cell 22, 37-46
(39) Wunderlich,F., Herlan,G. (1977) J. Cell Biol. 73, 271-278
(40) Wunderlich,F., Giese,G., Bucherer,C. (1978) J. Cell Biol. 79, 479-490
(41) Giese,G., Wunderlich,F. (1980) J. Biol. Chem. 255, 1716-1721
(42) Barrack,E.R., Hawkins,E.F., Allen,S.L., Hicks,L.L., Coffey,D.S. (1977) Biochem. Biophys. Res. Comm. 79, 829-836
(43) Barrack,E.R., Hawkins,E.F., Coffey,D.S. (1979) in: Steroid Hormone Receptor Systems (Leavitt,W.W., Clark, J.H., eds.) Plenum Press, New York, p. 47-70
(44) Barrack,E.R., Coffey,D.S. (1980) J. Biol. Chem. 255, 7265-7275
(45) Barrack,E.R., Coffey,D.S. (1982) Recent Prog. Horm. Res. 38, 133-195
(46) Agutter,P.S., Birchall,K. (1979) Exp. Cell Res. 124, 453-460
(47) Sevaljević,L., Poznanović,G., Petrović,M., Krtolica,K. (1981) Biochem. Intl. 2, 77-84
(48) Johnson,L.K., Vlodavsky,I., Baxter,J.D., Gospodarowicz, D. (1980) Nature 287, 340-343
(49) Hancock,R., Hughes,M.E. (1982) Biol. Cell 44, 201-212
(50) McCready,S.J., Jackson,D.A., Cook,P.R. (1982) Progr. Mut. Res. 4, 113-130
(51) Small,D., Nelkin,B., Vogelstein,B. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 5911-5915
(52) Risley,M.S., Einheber,S. (1982) J. Cell Biol. 95, 79a
(53) Adolph,K.W. (1980) Exp. Cell Res. 125, 95-103
(54) Lebkowski,J.S., Laemmli,U.K. (1982) J. Mol. Biol. 156, 309-324

(55) Lebkowski,J.S., Laemmli,U.K. (1982) J. Mol. Biol. 156, 325-344
(56) Igó-Kemenes,T., Zachau,H.G. (1977) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 41, 109-118
(57) Wanka,F., Mullenders,L.H.F., Bekers,A.G.M., Pennings, L.J., Aelen,J.M.A., Eygensteyn,J. (1977) Biochem. Biophys. Res. Comm. 74, 739-747
(58) Razin,S.V., Mantieva,V.L., Georgiev,G.P. (1978) Nucleic Acids Res. 5, 4737-4751
(59) Razin,S.V., Mantieva,V.L., Georgiev,G.P. (1979) Nucleic Acids Res. 7, 1713-1735
(60) Matsumoto,L.H. (1981) Nature 294, 481-482
(61) Basler,J., Hastie,N.D., Pietras,D., Matsui,S.-I., Sandberg,A.A., Berezney,R. (1981) Biochemistry 20, 6921-6929
(62) Razin,S.V., Chernokhvostov,V.V., Roodyn,A.V., Zbarsky, I.B., Georgiev,G.P. (1981) Cell 27, 65-73
(63) Bodnar,J.W., Jones,C.J., Coombs,D.H., Pearson,G.D., Ward,D.C. (1983) Mol. Cell Biol. 3, 1567-1579
(64) Probst,H., Hofstaetter,T., Jenke,H.-S., Gentner,P.R., Müller-Scholz,D. (1983) Biochim. Biophys. Acta 740, 200-211
(65) Anderson,M.L.M. (1978) J. Mol. Biol. 118, 227-240
(66) Kowalski,J., Denhardt,D.T. (1978) Nucleic Acids Res. 5, 4355-4373
(67) Karzel,K. (1965) Med. Pharmacol. Exp. 12, 137-146
(68) Schindler,R., Day,M., Fischer,G.A. (1965) Cancer Res. 19, 47-53
(69) Probst,H., Maisenbacher,J. (1973) Exp. Cell Res. 78, 335-344
(70) Maisenbacher,J. (1973) Dissertation, Universität Tübingen
(71) Venetianer,P. (1980) Methods Enzymol. 65, 109-112
(72) Bernardi,G. (1969) Biochim. Biophys. Acta 174, 423-434
(73) Tiselius,A., Hjerten,S., Levin,O. (1956) Arch. Biochem. Biophys. 65, 132-155
(74) Plagens,U. (1978) Chromosoma 68, 1-19
(75) Gentner,P.R. (1975) Dissertation, Universität Tübingen
(76) Paoletti,C., Dutheillet-Lamonthézie,N., Jeanteur,P., Obrenovitch,A. (1967) Biochim. Biophys. Acta 149, 435-450
(77) Bäzner,S. (1982) Dissertation, Universität Tübingen
(78) Lyskov,V.N., Moshkovsky,I. (1969) Biochim. Biophys. Acta 190, 101-115
(79) Helftenbein,E. (1982) Dissertation, Universität Tübingen
(80) Probst,H., Ullrich,A., Krauss,G. (1971) Biochim. Biophys. Acta 254, 15-29
(81) Stumpf,C. (1977) Dissertation, Universität Tübingen
(82) Chen,P.S., Toribara,T.Y., Warner,H. (1956) Anal. Chem. 28, 1756-1758
(83) Wobus,U. (1980) Isolierung, Fraktionierung und Hybridisierung von Nukleinsäuren. Verlag Chemie, Weinheim

(84) Britten,R.J., Graham,D.E., Neufeld,B.R. (1974) Methods Enzymol. 29, 363-418
(85) Brown,D.D., Wensink,P.C., Jordan,E. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 3175-3179
(86) Maniatis,T., Fritsch,E.F., Sambrook,J. (1982) Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory
(87) Handbook of Biochemistry, Selected Data of Molecular Biology (1970), 2nd edition (Sober,H.A.,ed.), Chemical Rubber Company
(88) Stöhr,H. (1979) Biochemische Diplomarbeit, Universität Tübingen
(89) Kiss,A., Sain,B., Csordas-Toth,E., Venetianer,P. (1977) Gene 1, 323-329
(90) Yuan,R. (1981) Annu. Rev. Biochem. 50, 285-315
(91) Aelen,J.M.A., Olpstelten,R.J.G., Wanka,F. (1983) Nucleic Acids Res. 11, 1181-1195
(92) Cook,P.R., Lang,J. (1984) Nucleic Acids Res. 12, 1069-1075
(93) Biezunski,N. (1981) Chromosoma 84, 87-109
(94) Goldberg,G.I., Collier,I., Cassel,A. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 6887-6891
(95) Kornberg,A. (1980) in: DNA Replication. Freeman, San Francisco, p. 443-466
(96) Pashev,I.G., Dimitrov,S.I., Ivanov,I.G., Markov,G.G. (1983) Eur. J. Biochem. 133, 379-382
(97) Studier,F.W. (1965) J. Mol. Biol. 11, 373-390
(98) Hörz,W., Zachau,H.G. (1977) Eur. J. Biochem. 73, 383-392
(99) Botchan,M., McKenna,G., Sharp,P.A. (1973) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 42, 351-360
(100) Rinehart,F.P., Schmid,C.W. (1976) Biochim. Biophys. Acta 425, 451-462
(101) Biro,P.A., Carr-Brown,A., Southern,E.M., Walker,P.M.B. (1975) J. Mol. Biol. 94, 71-86
(102) Walker,P.M.B. (1971) Progr. Biophys. Mol. Biol. 23, 145-190
(103) Corneo,G., Ginelli,E., Soave,C., Bernardi,G. (1968) Biochemistry 7, 4373-4379
(104) Berezney,R. (1979) Exp. Cell Res. 123, 411-414
(105) Berezney,R., Buchholtz,L.A. (1978) J. Cell Biol. 79, 130a
(106) Feller,W. (1971) An Introduction to Probability Theory and its Applications, Vol. 11. John Wiley and Sons, New York
(107) Milner,G.R. (1969) J. Cell Sci. 4, 569-582
(108) Milner,G.R. (1969) Nature 221, 71-72
(109) Berezney,R. (1981) in: International Cell Biology 1980-1981 (Schweiger,H.G.,ed.), Springer-Verlag, New York, p. 214-224
(110) Comings,D.E., Wallack,A.S. (1978) J. Cell Sci. 34, 233-246
(111) Alberts,B.M., Frey,L. (1970) Nature 227, 1313-1318

(112) Oishi,M. (1968) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60, 691-698
(113) Painter,R.B., Schaefer,T. (1969) Nature 221, 1215-1217
(114) Sato,S., Tanaka,M., Sugimura,T. (1970) Biochim. Biophys. Acta 209, 43-48
(115) Probst,H., Jenke,H.-S. (1973) Biochem. Biophys. Res. Comm. 52, 800-806
(116) Probst,H., Hofstaetter,T., Jenke,H.-S., Gentner,P.R., Wais,R. (1974) Biochim. Biophys. Acta 366, 11-22
(117) Probst,H., Jenke,H.-S., Gentner,P.R., Hofstaetter,T. (1975) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 635-645
(118) Probst,H., Hofstaetter,T., Jenke,H.-S., Gentner,P.R. (1976) Biochim. Biophys. Acta 442, 58-65
(119) Probst,H., Hofstaetter,T., Stumpf,C., Fraterman,A. (1979) Biochim. Biophys. Acta 561, 132-146
(120) Schildkraut,C.L., Marmur,J., Doty,P. (1962) J. Mol. Biol. 4, 430-443
(121) Bernardi,G. (1969) Biochim. Biophys. Acta 174, 423-434
(122) Bernardi,G. (1969) Biochim. Biophys. Acta 174, 435-448
(123) Martinson,H.G. (1973) Biochemistry 12, 2731-2736
(124) Wilson,D.A., Thomas Jr.,C.A. (1973) Biochim. Biophys. Acta 331, 333-340
(125) Bernardi,G., Kawasaki,T. (1968) Biochim. Biophys. Acta 160, 301-310
(126) Allen,S.L., Berezney,R., Coffey,D.S. (1977) Biochem. Biophys. Res. Comm. 75, 111-116
(127) Schweiger,A., Kostka,G. (1983) Biochem. Biophys. Res. Comm. 114, 183-189
(128) Tahin,Q.S., Blum,M., Carofoli,E. (1981) Eur. J. Biochem. 121, 5-13
(129) DePamphilis,M.L., Wasserman,P.M. (1980) Annu. Rev. Biochem. 49, 627-666
(130) Coombs,D.H, Pearson,G.D. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5291-5295
(131) Coombs,D.H., Robinson,A.J., Bodnar,J.W., Jones,C.J., Pearson,G.D. (1979) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43, 741-753
(132) Werner,D., Petzelt,C. (1981) J. Mol. Biol. 150, 297-302
(133) Werner,D., Zimmermann,H.-P., Rauterberg,E., Spalinger, J. (1981) Exp. Cell Res. 133, 149-158
(134) Valenzuela,M.S., Mueller,G.C., Dasgupta,S. (1983) Nucleic Acids Res. 11, 2155-2164
(135) Weidle,U. (1975) Biochemische Diplomarbeit, Universität Tübingen
(136) Bruchelt,G. (1977) Biochemische Diplomarbeit, Universität Tübingen
(137) Singleton,C.K., Klysik,J., Stirdivant,S.M., Wells,R.D. (1982) Nature 299, 312-316
(138) Lilley,D.M.J. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 6468-6472
(139) Panayotatos,N., Wells,R.D. (1980) Nature 289, 466-470
(140) Wang,A.H.-J., Quigley,G.J., Kolpak,F.J., van der Marel, G., van Boom,J.H., Rich,A. (1980) Science 211, 171-176

(141) Behe,M., Felsenfeld,G. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 1619-1623
(142) McFadden,G., Morgan,A.R. (1982) J. Theor. Biol. 97, 343-349
(143) Ogawa,T., Okazaki,T. (1980) Annu. Rev. Biochem. 49, 421-457
(144) Jacobson,M., Lark,K. (1973) J. Mol. Biol. 73, 371-396
(145) McCallum,M., Walker,P.M.B. (1967) Biochem. J. 105, 163-169
(146) Martinson,H.G., Wagenaar,E.B. (1977) Biochim. Biophys. Acta 474, 445-455
(147) Graham,D.E. (1970) Anal. Biochem. 36, 315-322
(148) Maniatis,T., Jeffrey,A., van de Sande,H. (1975) Biochemistry 14, 3787-3793
(149) Knippers,R. (1982) Molekulare Genetik. Thieme-Verlag, Stuttgart
(150) Jeppesen,P.G.N., Bankier,A.T. (1979) Nucleic Acids Res. 7, 49-67
(151) Brown,D.T., Westphal,M., Burlingham,B.T., Winterhoff, U., Doerfler,W. (1975) J. Virol. 16, 366-387
(152) Sharp,P.A., Moore,C., Haverty,J.L. (1976) Virology 75, 442-456
(153) Metzler,D.E. (1977) Biochemistry. Academic Press, New York
(154) Neuer,B., Plagens,U., Werner,D. (1983) J. Mol. Biol. 164, 213-235
(155) García,E., Gómez,A., Ronda,C., Escarmís,C., López,R. (1983) Virology 128, 92-104
(156) Bamford,D., McGraw,T., MacKenzie,G., Mindich,L. (1983) J. Virol. 47 311-316
(157) Stahl,H., Bauer,M., Knippers,R. (1983) Eur. J. Biochem. 134, 55-61
(158) Tse,Y.-C., Kirkegaard,K., Wang,J.C. (1980) J. Biol. Chem. 255, 5560-5565
(159) Young,T.-S., Kim,S.-H., Modrich,P., Beth,A., Jay,E. (1981) J. Mol. Biol. 145, 607-610
(160) McPherson,A., Jurnak,F., Wang,A., Kolpak,F., Rich,A. (1980) Biophys. J. 32, 155-173
(161) Giegé,R., Lorber,B., Ebel,J.-P., Moras,D., Thierry, J.-C. (1980) Compt. Rend. Acad. Sci. Paris Ser. D 291, 393-396
(162) Hata,T., Yoshikawa,M., Sato,S., Tamura,C. (1975) Acta Crystallogr. B 31, 312-314
(163) Ohki,M., Takenaka,A., Shimanouichi,H., Sasada,Y. (1977) Acta Crystallogr. B 33, 2954-2956
(164) Ishida,T., Inoue,M. (1981) Biochem. Biophys. Res. Comm. 99, 149-154
(165) Berman,H.M., Hamilton,W.C., Rousseau,R.J. (1973) Biochemistry 12, 1809-1814
(166) Woo,N.H., Seeman,N.C., Rich,A. (1979) Biopolymers 18, 539-552
(167) Ohki,M, Takenaka,A., Shimanouchi,H., Sasada,Y. (1977) Acta Crystallogr. B 33, 2956-2958

(168) Narayanan,P., Berman,H.M. (1977) Acta Crystallogr. B 33, 2047-2051
(169) Durand,M., Maurizot,J.-C., Borazan,H.N., Hélène,C. (1975) Biochemistry 14, 563-570
(170) Pörschke,D., Ronnenberg,J. (1981) Biophys. Chem. 13, 283-290
(171) Gabbay,E.J., Sanford,K., Baxter,C.S., Kapicak,L. (1973) Biochemistry 12, 4021-4029
(172) Matthews,D.A., Alden,R.A., Freer,S.T., Xuong,N.-H., Kraut,J. (1979) J. Biol. Chem. 254, 4144-4151
(173) Cotton,F.A., Hazen,E.A., Legg,M.J. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 2551-2555
(174) Richards,F.M., Wyckoff,H.W. (1973) in: Atlas of Molecular Structures in Biology (Phillips,D.C., Richards, F.M., eds.) Vol. 1, Oxford Press, London
(175) Berman,H.M., Neidle,S., Zimmer,C., Thrum,H. (1979) Biochim. Biophys. Acta 561, 124-131
(176) Anderson,W.F., Ohlendorf,D.H., Takeda,Y., Matthews,B.W. (1981) Nature 290, 754-758
(177) Pabo,C.O., Lewis,M. (1982) Nature 298, 443-447
(178) McKay,D.B., Steitz,T.A. (1981) Nature 290, 744-749
(179) Coleman,J.E., Anderson,R.A., Ratcliffe,R.G., Armitage, I.M. (1976) Biochemistry 15, 5419-5430
(180) Feinberg,A.P., Coffey,D.S. (1982) in: The Nuclear Envelope and the Nuclear Matrix (Maul,G.G.,ed.). Alan R. Liss, New York, p. 293-305
(181) Igo-Kemenes,T., Hörz,W., Zachau,H.G. (1982) Annu. Rev. Biochem. 51, 89-121
(182) Denhardt,D.T., Kowalski,J., Miyamoto,C. (1978) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43, 243-252
(183) Siegmann,D.W., Werner,R. (1981) Eur. J. Biochem. 120, 497-509
(184) Hartwig,M. (1978) Acta Biol. Med. Germ. 37, 421-432
(185) Benyajati,C., Worcel,A. (1976) Cell 9, 393-407
(186) Pinon,R., Salts,Y. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 2850-2854
(187) Vogelstein,B., Nelkin,B., Pardoll,D.M., Hunt,B.F. (1982) in: The Nuclear Envelope and the Nuclear Matrix (Maul,G.G.,ed.). Alan R. Liss, New York, p. 169-181

Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren folgende Damen und Herren:

Anatomie: M. Arnold, U. Drews, W. Graumann, C. Klessen, K. Mörike, K. Reutter

Anorganische Chemie: D. Krug, U. Kunze, E. Lindner, J. Strähle

Botanik: W. Mayer, H. Metzner

Genetik: W. Seyffert, H. Biessmann, G. Forkmann, V. Hemleben, H. Lange, M. Renz, H. Ritter, D. Sperlich

Mathematik: H. Pommer

Medizinische Soziologie: U. Reichwald

Medizinische Terminologie: A. Arnold

Mikrobiologie: V. Braun, J. Höltje, K. Poralla, H. Zähner

Organische Chemie: E. Bayer, M. Hanack, H. Hagenmaier, G. Jung, W. Rundel, V. Schurig, H. Stegmann, H. Suhr, W. Voelter

Pharmakologie und Toxikologie: U. Breyer-Pfaff, M. Bühler, H. Frank, E. Pfaff, H. Remmer, G. Schmalzing, M. Schwenk

Physik: F. Gönnenwein, W. Nakel, G. Staudt

Physikalische Biochemie: W. Voelter

Physikalische und Theoretische Chemie: W. Braun, R. Hamm, H. Mauser, D. Oelkrug, F. Seelig, W. Zeil

Physiologie: E. Betz, R. Jacob, G. Kissling

Physiologische Chemie und Biochemie: H. Probst, H. Bisswanger, K. Eisele, K. Entian, R. Gebhardt, J. Guglielmi, S. Hörnle, D. Mecke, U. Weber, G. Weitzel, A. Wendel, U. Weser

Psychologie: M. Greitemeyer, K. Mayer

Strahlenschutzkunde: U. Feine, E. Kallee, H.-J. Reinecke

Zoologie: K.G. Grell, H. Günzl

Lebenslauf

Am 14. Juni 1957 wurde ich, Richard Herzog, als Sohn des Verlegers Dr. iur. Herbert Herzog und seiner Ehefrau Dr. Inge Herzog, Diplom-Chemikerin, in Madrid (Spanien) geboren.

Ich trat am 2. Oktober 1963 in die erste Grundschulklasse der Deutschen Schule Madrid ein und besuchte die Schule dreizehn volle Zeitschuljahre in aufsteigenden Klassen. Am 25. Mai 1976 erhielt ich das Zeugnis der allgemeinen Hochschulreife.

Im Oktober desselben Jahres immatrikulierte ich mich an der Universität Tübingen für das Studium der Biochemie. Ein Jahr später nahm ich zusätzlich das Studium der Humanmedizin auf. Den ersten Teil des Vordiploms legte ich am 10. Oktober 1977 und den zweiten am 9. April 1979 ab. Die ärztliche Vorprüfung bestand ich am 18. März 1980. Den mündlichen Teil der Diplom-Hauptprüfung in Biochemie legte ich am 12. Februar 1981 ab. Anschließend fertigte ich meine Diplomarbeit unter der Leitung von Prof. Dr. H. Probst an, die ich am 29. September abschloß.

Seit Oktober 1981 arbeitete ich unter Anleitung von Prof. Dr. H. Probst am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen an der vorliegenden Dissertation „DNA-Kernmatrix-Beziehungen in rasch proliferierenden tierischen Zellen", die ich im Mai 1984 abschloß.

Vom 1. April 1977 bis 30. September 1981 war ich Stipendiat der Studienstiftung des Deutschen Volkes. Vom 1. Januar 1982 bis 31. Dezember 1983 erhielt ich ein Doktoranden-Stipendium vom Fonds der Chemischen Industrie.